



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

ÁREA DE GENÉTICA

TESIS DOCTORAL

Funciones fisiológicas de la detoxificación del óxido nítrico en
Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli*:
El papel de las flavohemoglobinas

Eduardo Enrique Argotti Valencia

2016

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

ÁREA DE GENÉTICA



VNIVERSIDAD
DSALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO HISPANOLUSO DE
INVESTIGACIONES AGRARIAS

Funciones fisiológicas de la detoxificación del óxido nítrico (NO)
en *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*:
El papel de las flavohemoglobinas

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado: Agrobiotecnología
Órgano responsable del Programa de Doctorado:
Departamento de Microbiología y Genética

Eduardo Enrique Argotti Valencia

Salamanca, 2016

D. Luis Román Fernández Lago, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada “**Funciones fisiológicas de la detoxificación del óxido nítrico en *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: El papel de las flavohemoglobinas**”, ha sido realizada en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca por **D. Eduardo Enrique Argotti Valencia**, bajo la dirección de los doctores Prof. Dr. Ernesto Pérez Benito y Prof. Dr. José María Díaz Mínguez y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 12 de abril de 2016.

Fdo: D. Luis Román Fernández Lago

Dr. D. Ernesto Pérez Benito y Dr. D. José María Díaz Mínguez, Profesores Titulares del Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada “**Funciones fisiológicas de la detoxificación del óxido nítrico en *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: El papel de las flavohemoglobinas**”, ha sido realizada en el Área de Genética del Departamento de Microbiología y Genética y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección, por **D. Eduardo Enrique Argotti Valencia**, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendemos el presente certificado en Salamanca a 12 de abril de 2016.

Fdo: Dr. D. Ernesto Pérez Benito

Fdo: Dr. D. José María Díaz Mínguez

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio 1 del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), Departamento de Microbiología y Genética, de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los Profesores Dr. Ernesto Pérez Benito y Dr. José María Díaz Mínguez. Su ejecución ha sido posible gracias a la financiación de los proyectos AGL2012-39876-C02 y AGL2015-66131-C2-1-R (Ministerio de Economía y Competitividad). Durante el desarrollo de la Tesis, he disfrutado de una beca de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador (SENESCYT).

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral ha requerido un gran esfuerzo y una intensa dedicación sin la cual no hubiese sido posible su elaboración y la cooperación de todas y cada una de las personas e instituciones que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en los momentos más duros y difíciles.

En primer lugar quiero agradecer al Gobierno del Ecuador, a la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), por concederme esta beca para cursar estudios de Doctorado y hacer realidad este sueño que parecía inalcanzable.

A mis Tutores, Dr. Ernesto Pérez Benito y Dr. José María Díaz Mínguez, por haberme aceptado en su grupo de investigación y haber confiado en mí, por brindarme su constante apoyo y ayuda en los momentos que más he necesitado; sin su implicación, orientación y supervisión en el día a día, así como en la redacción del presente manuscrito, esta investigación no hubiese tenido lugar.

A todos los que son y han sido mis compañeros de laboratorio, con los que tantos días he compartido: Walter Vargas, Vega Tello, Daniela Santander, Virginia Casado, Jonathan Niño, José María Sanz, Raúl Martín y Wilson Acosta.

A mis suegros por su constante apoyo para que no desmaye durante estos cuatro años de intenso trabajo y dedicación.

A mí madre por su constante apoyo a la distancia y siempre convencida de que tengo la suficiente capacidad para llegar a donde yo quiera y vencer todos los obstáculos que se presentan a diario.

A mí querida esposa, mi compañera, mi apoyo, mi fortaleza, cómplice de mis triunfos y que jamás se ha opuesto a mis caprichos y objetivos que me he propuesto.

A mis hijos Kevin y Karen la razón de mi vida.

Eduardo Enrique Argotti Valencia

A mí Dios.
Por su infinito amor

ÍNDICE

ÍNDICES

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XV
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XVII

RESUMEN

XIX

1 INTRODUCCIÓN

1

1.1	Hongos fitopatógenos.	1
1.2	El género <i>Fusarium</i> .	1
1.2.1	Morfología.	2
1.2.2	Taxonomía del género <i>Fusarium</i> .	2
1.2.3	Especies anamórficas y teleomórficas del género <i>Fusarium</i> .	4
1.3.	El complejo de especies <i>Fusarium oxysporum</i> .	5
1.3.1	Descripción y características taxonómicas.	5
1.3.1.1	Morfología.	7
1.3.1.2	Ciclo de vida.	7
1.3.1.3	Capacidad infectiva: la fusariosis vascular	8
1.3.1.4.	Genes esenciales en patogenicidad y virulencia de <i>F. oxysporum</i> .	10
1.4	Genómica de <i>F. oxysporum</i> : genoma nuclear y genoma adaptativo, expansiones génicas.	13
1.5	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	14
1.5.1	Sintomatología y clasificación.	15
1.5.2	La importancia del cultivo de la judía.	15
1.6	El óxido nítrico.	17
1.6.1	Descripción	17
1.6.2	Funciones fisiológicas del NO.	18
1.6.2.1	Síntesis de NO en animales, plantas y hongos.	19
1.6.2.2	Óxido nítrico en la interacción planta-patógeno.	21
1.6.3	Fuentes de nitrógeno utilizadas por los hongos.	22
1.6.4	La denitrificación del nitrato en procariotas.	24

1.6.5	Desnitrificación y producción de NO en <i>F. oxysporum</i> .	25
1.7	Las flavohemoglobinas.	26
1.7.1	Origen de las flavohemoglobinas.	27
1.7.2	Estructura de las flavohemoglobinas	27
1.7.3	Funciones de las flavohemoglobinas.	28
1.7.3.1	Respuesta de las flavohemoglobinas al estrés nitrosativo y oxidativo.	28
1.7.3.2	Papel de las flavohemoglobinas en patogenicidad.	31
1.7.3.3	Papel de las flavohemoglobinas en la regulación del desarrollo.	32
	OBJETIVOS	35
	2 MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1	Organismos.	37
2.1.1	Plantas.	37
2.1.2	Hongos.	37
2.1.3	Bacterias.	38
2.2	Medios de cultivo.	39
2.2.1	Plantas.	39
2.2.2	Hongos.	39
2.2.2.1	Cultivo en medio sólido de <i>F. oxysporum</i> .	39
2.2.2.2	Cultivo en medio líquido de <i>F. oxysporum</i> .	40
2.2.2.3	Obtención de cultivos monospóricos.	40
2.2.3	Bacterias	41
2.2.3.1	Cultivo de <i>E. coli</i> DH α 5.	41
2.2.3.2	Cultivo de <i>A. tumefaciens</i> cepa AGL-1.	41
2.3	Ensayos de germinación.	42
2.3.1	Obtención de microconidios de <i>F. oxysporum</i> .	42
2.3.2	Cultivo estático de <i>F. oxysporum</i> .	43
2.4	Ensayos de crecimiento saprofítico.	43
2.4.1	Ensayos de sensibilidad a estrés nitrosativo.	43
2.5	Ensayos de infección <i>in planta</i> .	44
2.5.1	Ensayos de infección en invernadero.	44
2.5.2	Ensayos de infección en medio de cultivo hidropónico.	45
2.6	Extracción de ácidos nucleicos.	45

2.6.1	ADN genómico de <i>F. oxysporum</i> .	45
2.6.1.1	Método "TENSP".	46
2.6.1.2	Método CTAB.	47
2.6.1.3	Extracción de ADN genómico mediante método rápido.	47
2.6.2	Extracción de ADN plasmídico.	48
2.6.2.1	Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.	48
2.6.2.2	Minipreparación de ADN plasmídico con el kit comercial NucleoSpin®Plasmid.	48
2.6.2.3	Preparación de grandes cantidades de ADN de plásmidos de reducido número de copia.	49
2.6.3	Tratamientos enzimáticos del ADN.	50
2.6.3.1	Tratamiento con RNasa A.	50
2.6.3.2	Digestión con enzimas de restricción.	51
2.6.3.3	Ligaciones.	51
2.6.3.4	Defosforilación con fosfatasa alcalina (CIEF).	51
2.6.4	Obtención de ARN total de <i>F. oxysporum</i> .	52
2.6.4.1	Método Trizol.	52
2.6.4.2	Obtención de ARN con el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega).	53
2.6.4.3	Tratamiento de ARN con DNAasa.	54
2.6.4.4	Cuantificación de ácidos nucleicos.	54
2.7	Electroforesis de ácidos nucleicos.	54
2.7.1	Electroforesis de ADN.	54
2.7.2	Electroforesis de ARN.	55
2.7.3	Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	55
2.8	Vectores de clonación.	56
2.8.1	Vector de clonación pGEM-T Easy.	56
2.8.2	Vector de clonación pRF-HU2.	56
2.8.3	Vector de clonación pEA-FU.	58
2.8.4	Vector de silenciamiento pVIR-RNAi.	59
2.9	Transformaciones.	60
2.9.1	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .	60

2.9.2	Digestión de los vectores de clonación PRF-HU2, pVIR-RNAi y pEA-FU.	61
2.9.3	Ensayos de clonación con el sistema "USER Friendly Cloning".	62
2.9.3.1	Diseño de oligonucleótidos con un adaptador de uridina.	62
2.9.3.2	Amplificación de las regiones flanqueantes.	62
2.9.3.3	Reacción de ligación con USER Friendly Cloning.	63
2.9.4	Transformación de <i>E. coli</i> .	63
2.9.5	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .	63
2.9.5.1	Preparación de células competentes.	63
2.9.5.2	Electroporación de <i>A. tumefaciens</i> .	64
2.9.5.3	Transformación de <i>F. oxysporum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> (ATM).	64
2.9.5.4	Ensayo de cocultivo de <i>A. tumefaciens</i> con <i>F. oxysporum</i> .	65
2.9.5.5	Identificación de transformantes.	65
2.10	Construcción de mutantes dobles.	66
2.10.1	Silenciamiento genético.	66
2.11	Complementación de genes.	66
2.12	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	67
2.12.1	PCR estándar.	67
2.12.2	RT-PCR.	68
2.12.3	PCR en Tiempo Real.	68
2.12.4	Secuenciación.	69
2.12.5	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	70
2.13	Hibridación de ácidos nucleicos.	72
2.13.1	Marcaje de sondas.	72
2.13.2	Hibridación Southern blot.	73
2.13.3	Hibridación Northern blot.	75
2.14	Microscopía.	76
2.14.3	Microscopía óptica.	76
2.15	Análisis de datos.	76
2.15.1	Diseño de oligonucleótidos.	76
2.15.2	Diseño de plásmidos.	76

2.15.3	Alineamiento de secuencias.	76
2.15.4	Búsqueda y comparación de secuencias.	77
2.15.5	Diseño de árboles filogenéticos.	77
2.15.6	Búsqueda de secuencias de <i>F. oxysporum</i> .	77
2.15.7	Cuantificación de ADN y ARN.	77
2.15.8	Edición de texto y tablas.	77
2.15.9	Análisis estadístico.	78
3	RESULTADOS	79
3.1	Identificación de los genes codificadores de enzimas tipo flavohemoglobina de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	79
3.1.1	Análisis de las bases de datos de secuencias de genomas de <i>Fusarium</i> .	79
3.1.2	Detección mediante PCR de genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	80
3.1.3	Caracterización del entorno genómico de los genes codificadores de flavohemoglobinas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	83
3.2	Análisis estructural de los genes codificadores de flavohemoglobinas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	85
3.2.1	Secuencia de los genes <i>FHG</i> de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	86
3.2.1.1	Gen <i>FHG1</i> de FOP-SP1.	86
3.2.1.2	Gen <i>FHG2</i> de FOP-SP1.	87
3.2.1.3	Gen <i>FHG3</i> de FOP-SP1.	88
3.2.1.4	Gen <i>FHG4</i> de FOP-SP1.	89
3.2.2	Análisis de la región codificante de los genes <i>FHG</i>	90
3.2.3	Análisis de las regiones promotora y terminadora de los genes <i>FHG</i> .	91
3.3	Análisis de las proteínas deducidas codificadas por los genes <i>FHG1</i> , <i>FHG2</i> , <i>FHG3</i> y <i>FHG4</i> .	94
3.3.1	Dominios funcionales de las proteínas <i>FHG</i> .	94
3.3.2	Localización subcelular de las proteínas <i>FHG</i> .	99
3.4	Análisis filogenético de los genes codificadores de flavohemoglobinas.	101
3.5	Análisis de expresión de los genes <i>FHG</i> .	104
3.5.1	Condiciones para el análisis durante el crecimiento saprofítico y en respuesta a NO.	104

3.5.2	Análisis de expresión de los genes <i>FHG</i> durante el crecimiento saprofítico y en respuesta a NO.	107
3.5.2.1	Expresión de <i>FHG1</i> .	108
3.5.2.2	Expresión de <i>FHG2</i> .	109
3.5.2.3	Expresión de <i>FHG3</i> .	110
3.5.2.4	Expresión de <i>FHG4</i> .	112
3.5.3	Análisis de expresión de los genes <i>FHG</i> en plantas de judía infectadas con estirpes de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	112
3.5.3.1	Análisis de expresión de los genes <i>FHG</i> en plantas de judía infectadas con FOP-SP1.	114
3.5.3.2	Análisis de expresión de los genes <i>FHG</i> en plantas de judía infectadas con FOP-SP4.	115
3.6	Análisis funcional de los genes tipo flavohemoglobina.	117
3.6.1	Construcción de los vectores de transformación.	117
3.6.2	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .	120
3.6.3	Transformación de <i>F. oxysporum</i> de f. sp. <i>phaseoli</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> .	121
3.6.4	Identificación de mutantes por reemplazamiento génico de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	121
3.6.4.1	Identificación de transformantes del gen <i>FHG1</i> .	123
3.6.4.2	Identificación de transformantes del gen <i>FHG2</i> .	125
3.6.4.3	Identificación de transformantes del gen <i>FHG3</i> .	127
3.6.4.4	Identificación de transformantes del gen <i>FHG4</i> .	129
3.7	Análisis mediante hibridación Southern de los transformantes de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	131
3.7.1	Análisis de los mutantes en el gen <i>FHG1</i> .	132
3.7.2	Análisis de los mutantes en el gen <i>FHG2</i> .	133
3.7.3	Análisis de los mutantes en el gen <i>FHG3</i> .	135
3.7.4	Análisis de los mutantes en el gen <i>FHG4</i> .	136
3.8	Caracterización fisiológica de los mutantes <i>FHG</i> .	138
3.8.1	Análisis de la capacidad de crecimiento saprofítico y de la sensibilidad a estrés nitrosativo de los mutantes Δ <i>FHG</i> .	139
3.8.1.1	Análisis de mutantes Δ <i>FHG</i> de FOP-SP1.	140
3.8.1.2	Análisis de mutantes Δ <i>FHG</i> de FOP-SP4.	143
3.8.2	Análisis de germinación de microconidios de mutantes Δ <i>FHG</i> .	146

3.8.2.1	Análisis de germinación de microconidios de mutantes ΔFHG de FOP-SP1.	147
3.8.2.2	Análisis de germinación de microconidios de mutantes ΔFHG de FOP-SP4.	150
3.8.3	Ensayos de infección <i>in planta</i> con los mutantes ΔFHG .	153
3.9	Ensayos de complementación de la mutación $\Delta FHG1$.	155
3.9.1	Construcción del vector de complementación.	156
3.9.2	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .	156
3.9.3	Transformación de mutantes $\Delta FHG1$ de FOP-SP1 y FOP-SP4.	157
3.9.4	Identificación de transformantes que han incorporado la construcción de complementación.	157
3.9.5	Análisis fenotípico de los mutantes portadores de la construcción de complementación de la mutación $\Delta FHG1$.	160
3.10	Obtención y caracterización de dobles mutantes $\Delta FHG2-FHG1RNAi$.	163
3.10.1	Construcción del vector de silenciamiento.	164
3.10.2	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> .	164
3.10.3	Transformación de mutantes $\Delta FHG2$ con el vector de silenciamiento pVIR-RNAi- <i>FHG1</i> .	165
3.10.3.1	Identificación y selección de transformantes $\Delta FHG2-FHG1RNAi$.	166
3.10.3.2	Análisis fenotípico de los dobles mutantes $\Delta FHG2-FHG1RNAi$.	169
3.10.3.3	Ensayos de infección <i>in planta</i> con los dobles mutantes $\Delta FHG2-FHG1RNAi$.	174
4	DISCUSIÓN	177
4.1	Relaciones filogenéticas de los genes <i>FHG</i> de FOP.	177
4.2	Análisis de expresión y funcional de los genes de <i>FHG</i> .	179
4.3	Los genes <i>FHG</i> de FOP muestran patrones de expresión diferenciales.	180
4.4	Los genes <i>FHG1</i> y <i>FHG2</i> confieren resistencia a estrés nitrosativo.	185
4.5	El papel de <i>FHG1</i> y <i>FHG2</i> en la detoxificación de NO evidencia una función del NO sobre germinación.	188
4.6	El papel del NO y de las flavohemoglobinas en diferenciación y desarrollo.	190
4.7	El papel de los genes <i>FHG</i> durante la interacción con el huésped.	193
5	CONCLUSIONES	195
6	BIBLIOGRAFÍA	197

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida de <i>F. oxysporum</i> (Beckman, 1987).	8
Figura 2.	Estructura tridimensional de la proteína flavohemoglobina de <i>E. coli</i> .	28
Figura 3.	Mapa circular del Plásmido pGEM-T easy.	56
Figura 4.	Mapa circular del Plásmido PRF-HU2 y estrategia de clonación.	57
Figura 5.	Mapa de construcción del plásmido pEA-FU utilizado para complementación.	58
Figura 6.	Mapa circular del plásmido pVIR-RNAi utilizado para silenciamiento genético.	60
Figura 7.	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de secuencias derivadas de la región codificante de los genes codificadores de proteínas de tipo flavohemoglobina utilizando ADN genómico de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	82
Figura 8.	Análisis tipo Southern de los genes codificadores de enzimas flavohemoglobina en las diferentes estirpes de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	84
Figura 9.	Secuencia de nucleótidos del gen <i>FHG1</i> y de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.	86
Figura 10.	Secuencia de nucleótidos del gen <i>FHG2</i> y de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.	87
Figura 11.	Secuencia de nucleótidos del gen <i>FHG3</i> y de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.	88
Figura 12.	Secuencia de nucleótidos del gen <i>FHG4</i> y de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida.	89
Figura 13.	Alineamiento de secuencias de las proteínas tipo flavohemoglobina de FOP-SP1.	95
Figura 14.	Dominios funcionales característicos de las proteínas de tipo flavohemoglobina, y sus posiciones relativas, identificados en las proteínas deducidas codificadas por los genes tipo flavohemoglobina de FOP-SP1.	96

Figura 15.	Dominios globina identificados en proteínas representativas con el programa CCD semejantes al dominio globina presente en la proteína codificada por el gen <i>FHG1</i> .	98
Figura 16.	Dominios oxidoreductasa FAD (FAD_binding_ 6) identificados en proteínas representativas con el programa CCD semejantes al dominio oxidoreductasa FAD (FAD_binding_ 6) presente en la proteína codificada por el gen <i>FHG1</i> .	98
Figura 17.	Dominio oxidoreductasa NAD (NAD_binding_ 1) identificados en proteínas representativas con el programa CCD semejantes al dominio oxidoreductasa NAD (NAD_binding_ 1) presente en la proteína codificada por el gen <i>FHG1</i> .	99
Figura 18.	Árbol filogenético de las proteínas de tipo flavohemoglobina.	102
Figura 19.	Germinación de microconidios de FOP-SP1 en medio mínimo con 1% de glucosa (MMG) y MMG suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) o 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N).	105
Figura 20.	Germinación de microconidios de FOP-SP4 en medio mínimo suplementado con 1% de glucosa (MMG) o en MMG suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) o 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N).	106
Figura 21.	Análisis de expresión del gen <i>FHG1</i> de las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4.	108
Figura 22.	Análisis de expresión del gen <i>FHG2</i> de las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4.	110
Figura 23.	Análisis de expresión del gen <i>FHG3</i> de las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4.	111
Figura 24.	Análisis de expresión del gen <i>FHG4</i> de las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4.	112
Figura 25.	Análisis de expresión <i>in planta</i> mediante RT-qPCR de los genes FHG de FOP-SP1.	115
Figura 26.	Análisis de expresión <i>in planta</i> mediante RT-qPCR de los genes FHG de FOP-SP4.	116
Figura 27.	Productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de FOP-SP1 de las regiones flanqueantes 5' y 3' de los genes <i>FHG</i> .	119

Figura 28.	Mapa de restricción de los plásmidos construidos a partir del plásmido PRF-HU2 para el reemplazamiento génico de los genes <i>FHG</i> de FOP-SP1 y FOP-SP4.	120
Figura 29.	Estrategia de reemplazamiento génico del gen <i>FHG1</i> de FOP-SP1 y FOP-SP4.	123
Figura 30.	Productos de PCR obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos FHG1-KN-FW y HphBC (5') y RHG1-KN-RV y HphAC (3') utilizando como molde ADN genómico de los transformantes obtenidos con el plásmido pRF-HU2- <i>FHG1</i> .	124
Figura 31.	Estrategia de reemplazamiento génico del gen <i>FHG2</i> de FOP-SP1 y FOP-SP4.	125
Figura 32.	Productos de PCR obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos FHG2-KN-FW y HphBC (5') y RHG2-KN-RV y HphAC (3') utilizando como molde ADN genómico de los transformantes obtenidos con el plásmido pRF-HU2- <i>FHG2</i> .	126
Figura 33.	Estrategia de reemplazamiento génico del gen <i>FHG3</i> de FOP-SP1 y FOP-SP4.	127
Figura 34.	Productos de PCR obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos FHG3-KN-FW y HphBC (5') y RHG3-KN-RV y HphAC (3') utilizando como molde ADN genómico de los transformantes obtenidos con el plásmido pRF-HU2- <i>FHG3</i> .	128
Figura 35.	Estrategia de reemplazamiento génico del gen <i>FHG4</i> de FOP-SP1 y FOP-SP4.	129
Figura 36.	Productos de PCR obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos FHG4-KN-FW y (5') y RHG4-KN-RV y HphAC (3') utilizando como molde ADN genómico de los transformantes obtenidos con el plásmido pRF-HU2- <i>FHG4</i> .	130
Figura 37.	Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes en los que se ha determinado mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen <i>FHG1</i> en las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4.	133
Figura 38.	Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes en los que se ha determinado mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen <i>FHG2</i> en las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4.	134

Figura 39.	Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes en los que se ha determinado mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen <i>FHG3</i> en las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4.	136
Figura 40.	Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes en los que se ha determinado mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen <i>FHG4</i> en las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4.	137
Figura 41.	Crecimiento radial de las cepas mutantes de los genes <i>FHG</i> de FOP-SP1 y de la misma cepa control FOP-SP1 evaluados a los 5 días de crecimiento saprofítico.	142
Figura 42.	Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia de las cepas mutantes ΔFHG de FOP-SP1.	143
Figura 43.	Crecimiento radial de las cepas mutantes de los genes <i>FHG</i> de FOP-SP4 y de la cepa control FOP-SP4 evaluados a los 5 días de crecimiento saprofítico.	145
Figura 44.	Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia de las cepas mutantes ΔFHG de FOP-SP4.	146
Figura 45.	Efecto de NO en la germinación de microconidios de los mutantes de los genes de <i>FHG</i> de SP1 y de la propia cepa SP1, evaluadas a las 10 horas de cultivo.	149
Figura 46.	Porcentajes de reducción de la germinación de microconidios de las cepas mutantes ΔFHG de FOP-SP1.	150
Figura 47.	Efecto del NO en la germinación de microconidios de los mutantes de los genes de <i>FHG</i> de SP4 y de la propia cepa SP4, evaluadas a las 10 horas de cultivo.	151
Figura 48.	Porcentajes de reducción de la germinación de microconidios de las cepas mutantes ΔFHG de FOP-SP4.	152
Figura 49.	Evaluación de la agresividad de los mutantes ΔFHG de FOP-SP1 y FOP-SP4.	155
Figura 50.	Mapa de restricción del plásmido pEA-FU-FHG1 utilizado para la complementación de la mutación $\Delta FHG1$.	157

Figura 51.	Identificación de los transformantes de las cepas SP1- $\Delta FHG1$ -131 y SP4- $\Delta FHG1$ -244 que han incorporado el gen <i>FHG1</i> mediante transformación con el plásmido pEA-FU- <i>FHG1</i> .	159
Figura 52.	Evaluación de la sensibilidad a estrés nitrosativo de los mutantes complementados SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 y SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1 cultivados en MMG+A y MMG+N en ausencia y en presencia del donador de NO SNP (500 μ M).	161
Figura 53.	Evaluación de la eficiencia de germinación de microconidios de los mutantes complementados SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 y SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1 cultivados en MMG+A y MMG+N en ausencia y en presencia del donador de NO DETA (250 μ M) tomados a las 10 horas de cultivo.	162
Figura 54.	Producto de PCR amplificado a partir de ADN genómico de FOP-SP1 con los cebadores Sil-FHG1-FW y Sil-FHG1-RV.	164
Figura 55.	Mapa de restricción del plásmido pVIR-RNAi- <i>FHG1</i> utilizado para silenciamiento del gen <i>FHG1</i> .	165
Figura 56.	Expresión relativa del gen <i>FHG1</i> en los transformantes seleccionados obtenidos con el plásmido pVIR-RNAi- <i>FHG1</i> sobre fondo genético de los mutantes SP1- $\Delta FHG2$ -51 y SP4- $\Delta FHG2$ -314.	167
Figura 57.	Caracterización molecular de los transformantes SP1- $\Delta FHG2$ -51 y SP4- $\Delta FHG2$ -314 seleccionados en los experimentos de transformación llevados a cabo con el plásmido de silenciamiento pVIR-RNAi- <i>FHG1</i> .	169
Figura 58.	Evaluación del crecimiento saprofítico de mutantes $\Delta FHG2$ en los que se ha silenciado el gen <i>FHG1</i> .	174
Figura 59.	Cuantificación de la germinación de microconidios de mutantes $\Delta FHG2$ en los que se ha silenciado el gen <i>FHG1</i> .	173
Figura 60.	Ensayos de infección sobre la variedad de judía Blanca Riñón con estirpes de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	175

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Grupo representativo de formas especiales del complejo de especies de <i>F. oxysporum</i> .	6
Tabla 2.	Genes de patogenicidad y virulencia identificados en <i>F. oxysporum</i> (tomado de Michielse and Rep, 2009).	11
Tabla 3.	Estirpes representativas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> aislados de cultivos de judía de la comarca de “El Barco de Ávila”.	17
Tabla 4.	Estirpes silvestres y transformantes de <i>F. oxysporum</i> utilizadas en esta investigación.	37
Tabla 5.	Medios de cultivo utilizados en la transformación de <i>F. oxysporum</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> .	41
Tabla 6.	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo de investigación.	70
Tabla 7.	Códigos de genes codificadores de proteínas tipo flavohemoglobina del género <i>Fusarium</i> . Columna 1: <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , columna 2: <i>F. verticillinoides</i> ; columna 3: <i>F. graminearum</i> .	80
Tabla 8.	Códigos de los oligonucleótidos diseñados sobre los genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y utilizados en reacciones de PCR para detectar los genes ortólogos en <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> .	81
Tabla 9.	Porcentajes de identidad entre las secuencias de nucleótidos de las regiones codificantes de los genes <i>FHG1</i> , <i>FHG2</i> , <i>FHG3</i> y <i>FHG4</i> .	90
Tabla 10.	Ubicación de las hipotéticas cajas TATA y CAAT en la región promotora y secuencias consenso señal de poliadenilación reconocidos en los genes <i>FHG1</i> , <i>FHG2</i> , <i>FHG3</i> y <i>FHG4</i> .	91
Tabla 11.	Predicción de factores de transcripción que pueden unirse a la región promotora del gen <i>FHG1</i> .	92
Tabla 12.	Predicción de factores de transcripción que pueden unirse a la región promotora del gen <i>FHG2</i> .	92
Tabla 13.	Predicción de factores de transcripción que pueden unirse a la región promotora del gen <i>FHG3</i> .	93

Tabla 14.	Predicción de factores de transcripción que pueden unirse a la región promotora del gen <i>FHG4</i> .	93
Tabla 15.	Composición aminoacídica de las proteínas codificadas por los genes <i>FHG1</i> , <i>FHG2</i> , <i>FHG3</i> y <i>FHG4</i> .	94
Tabla 16.	Porcentaje de semejanza de las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas codificadas por los genes <i>FHG1</i> , <i>FHG2</i> , <i>FHG3</i> y <i>FHG4</i> de FOP-SP1.	95
Tabla 17.	Dominios funcionales presentes en las proteínas <i>FHG1</i> , <i>FHG2</i> , <i>FHG3</i> y <i>FHG4</i> .	97
Tabla 18.	Valores de probabilidad de localización subcelular de las proteínas <i>FHG</i> estimados con el programa de predicción MultiLoc2.	99
Tabla 19	Valores de probabilidad de localización mitocondrial, estimada con el programa de predicción TargetP, y de presencia de una presecuencia mitocondrial, estimada con el programa MITOFATES, de las proteínas <i>FHG</i> de FOP.	100
Tabla 20.	Códigos de los oligonucleótidos derivados de los genes <i>FHG</i> diseñados para la construcción de los vectores de reemplazamiento génico y tamaños de los fragmentos amplificados por PCR.	118
Tabla 21.	Códigos de los oligonucleótidos derivados de los genes <i>FHG</i> y del gen <i>hph</i> utilizados para la identificación de transformantes candidato y tamaños de los productos de PCR esperados en caso ocurrencia de recombinación homóloga en la región correspondiente.	122
Tabla 22.	Estirpes silvestres y cepas mutantes ΔFHG generadas en este trabajo y seleccionadas para su análisis fisiológico.	139
Tabla 23.	Valores de infección en plantas de judía variedad “Blanca Riñón” con las cepas mutantes ΔFHG de FOP estimados con la escala CIAT.	154
Tabla 24.	Ensayos de infección en plantas de judía variedad “Blanca Riñón” con los mutantes dobles. Evaluada con la escala CIAT.	174

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
CDP-Star	(2-Cloro-5-(4-metoxipiro(1,2-dioxietano-3,2'-(5'cloro)tríciclo[3.3.1.1.3.7]decan)-4il)-1-fenilfosfato disódico)
D.O.	Densidad óptica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DETA	Diethylenetriamine; N-(2-Aminoethyl)-1,2-ethanediamine; bis(2-Aminoethyl)amine
DIG	Digoxigenina-11-desoxiuridina-5'-trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Deoxinucleótidos-5'-trifosfato
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid: ácido etilendiaminotetraácetico
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FHG	Flavohemoglobina
<i>FHG1</i>	Gen flavohemoglobina 1
<i>FHG2</i>	Gen flavohemoglobina 2
<i>FHG3</i>	Gen flavohemoglobina 3
<i>FHG4</i>	Gen flavohemoglobina 4
FOP	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
FOL	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
GFP	Green Fluorescent Protein, proteína verde fluorescente
hpi	Horas post infección
l	Litro
IGS	<i>Intergenic Spacer</i> , región espaciadora intergénica
ITS	Internal transcribed spacer
Kb	1 kb Plus DNA ladder
Kg	Kilogramo
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
Mb	Megabases (1.000.000 pares de bases)
MCC	Medio de cocultivo
MI	Medio de Inducción
ml	Mililitro

mM	Milimolar
MM	Medio Mínimo
MMG	Medio Mínimo más glucosa
MMG+A	Medio Mínimo más glucosa con amonio
MMG+N	Medio Mínimo más glucosa con nitrato
MOPS	Ácido-3-morfolinopropanosulfónico
NO	Óxido nítrico
NAD	Nicotina adenina dinucleótido
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , marco de lectura abierta
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Papa dextrose agar
PDB	Caldo Papa dextrosa
PGM	Medio crecimiento plantas
rpm	Revoluciones por minuto
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i> , ADN polimórfico amplificado al azar
RH	Respuesta de hipersensibilidad
RNI	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	<i>Retrotranscriptase</i> - PCR, transcripción inversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i> , resistencia sistémica adquirida
SCAR	<i>Sequence characterized amplified region</i> , región amplificada, caracterizada y secuenciada
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SNP	Nitroprusiato sódico
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
Tm	Melting temperature, temperatura de fusión
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
αα	Aminoácido
μg	Microgramo
μM	Micromolar
μl	Microlitro

RESUMEN

Entre los factores bióticos que determinan mayores pérdidas económicas en los cultivos agrícolas se encuentran los hongos fitopatógenos. *F. oxysporum* constituye un complejo de especies con una considerable variación morfológica y fisiológica, cuyos individuos pueden crecer y multiplicarse como saprófitos sobre materia orgánica o bien colonizando plantas. El colectivo de estirpes patógenas puede infectar más de 100 especies vegetales distintas, e incluso hospedadores animales como el hombre. Individualmente, este abanico de posibilidades de infección se restringe a una especie o unas pocas especies del mismo género, lo cual permite la clasificación de las distintas estirpes de *F. oxysporum* en formas especiales que poseen un rango de infección muy estrecho. En particular, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, el objeto de estudio del presente trabajo, infecta y coloniza unas pocas especies del género *Phaseolus*, y, típicamente, *P. vulgaris*, provocando la marchitez vascular de la judía. Esta enfermedad presenta una incidencia notable en todas las regiones del mundo en las que se cultivan judías.

Los procesos de infección y colonización de las plantas atacadas son muy parecidos en todas las formas especiales de *F. oxysporum*. El hongo, habitual en los suelos, es capaz de penetrar las raíces del vegetal, especialmente a través de heridas o de las discontinuidades entre las raíces laterales y la raíz principal. Una vez dentro del tejido cortical avanza hacia el cilindro central radicular para diseminarse a continuación por los haces vasculares de la planta. La colonización de los haces xilemáticos del huésped provoca la obstrucción de los mismos y la reducción del aporte de agua y nutrientes a las partes aéreas de la planta, dando lugar a la marchitez característica de las infecciones causadas por *F. oxysporum*, lo cual finaliza en muchas ocasiones con la muerte de la planta.

El tipo de colonización eminentemente vascular característico de *F. oxysporum* no permite una fácil adscripción a cualquiera de las categorías de patógenos descritas, esto es, biotrofos, hemibiotrofos y necrotrofos. En ocasiones se considera su estilo de vida infeccioso como hemibiotrófico. La primera parte de su ciclo colonizador podría considerarse biotrófica; sin embargo, no está claro que en una segunda etapa degrade y destruya activamente los tejidos de la planta, como para considerarla típicamente necrotrófica.

La agresión por organismos patógenos desencadena en las plantas infectadas una compleja respuesta de defensa. Entre los mecanismos que participan en la misma destacan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de óxido nítrico (NO), moléculas muy reactivas, con un papel señalizador fundamental y que orquestan y coordinan los procesos que participan en la respuesta defensiva, en particular en la activación de la respuesta de hipersensibilidad (HR). El NO, en particular, resulta muy importante por la multiplicidad de papeles que desempeña. Desde el punto de vista de la respuesta defensiva vegetal, juega un doble papel: por una parte resulta esencial en la activación del programa de muerte celular programada que conduce a la muerte de las células que entran en contacto con el patógeno y, por otra, presenta una elevada toxicidad sobre la mayor parte de los microorganismos patógenos. Además, el NO tiene una intervención destacada en procesos de diferenciación y desarrollo en los organismos, incluidos los propios patógenos, lo cual implica que la modulación de su concentración necesariamente esté sometida a una estricta regulación.

Teniendo en cuenta que el NO es un gas que se difunde con suma facilidad y que la modulación de su concentración implica tanto al NO exógeno, producido por la planta infectada como parte de su respuesta defensiva, como al endógeno, producido por los procesos metabólicos del patógeno, resulta imprescindible el concurso de mecanismos de detoxificación. Las enzimas de tipo flavohemoglobina son enzimas con actividad dioxigenasa de NO dependiente de NADPH, FAD y O₂, que detoxifican NO produciendo nitrato. Estas enzimas están presentes únicamente en hongos y bacterias, no habiendo sido descritas ni en sistemas animales ni en plantas. En los distintos microorganismos en los que la actividad y la función de estas enzimas han sido investigadas se ha comprobado que son codificadas por genes de copia única o por pequeñas familias génicas y que confieren protección frente a condiciones de estrés nitrosativo. En modelos de patógenos animales las flavohemoglobinas son unos poderosos agentes detoxificadores de NO con un claro efecto en virulencia. En *Cryptococcus neoformans*, un patógeno humano, la enzima flavohemoglobina protege al hongo del daño nitrosativo producido por el NO liberado por los macrófagos. En el caso del *Erwinia chrysanthemi*, patógeno vegetal de naturaleza biotrofa, la enzima flavohemoglobina resulta esencial para que el patógeno pueda infectar a su planta huésped.

Debido a la importancia biológica de las proteínas tipo flavohemoglobina en el metabolismo del NO, el objetivo de nuestro trabajo de investigación fue determinar el papel de las

proteínas flavohemoglobinas en *F. oxysporum*. Mediante análisis bioinformático e hibridación tipo Southern se han identificado en este hongo fitopatógeno cuatro genes codificadores de enzimas tipo flavohemoglobina (FHG), siendo el organismo eucariota con más copias de genes *FHG* descritos hasta el momento. Los cuatro genes carecen de intrones y son de copia única. Las proteínas correspondientes, denominadas FHG1, FHG2, FHG3 y FHG4, presentan los tres dominios funcionales de una proteína tipo flavohemoglobina. FHG1, FHG2 y FHG3 tienen localización citoplasmática, mientras que FHG4 posee una secuencia señal de localización mitocondrial. El análisis filogenético agrupa a las proteínas FHG1, FHG2 y FHG3 en un clado que incluye a la mayor parte de las flavohemoglobinas de hongos, incluidas las dos o tres flavohemoglobinas descritas en otras especies del género *Fusarium*. La flavohemoglobina FHG4 se ubica en un clado diferente junto a proteínas FHG de especies del género *Aspergillus*, proteínas de localización mitocondrial que están más relacionadas con las flavohemoglobinas de bacterias desnitrificantes.

Los patrones de expresión de los genes *FHG* de *F. oxysporum* son indicativos de la existencia de mecanismos de regulación de la expresión en respuesta a distintos estímulos: desarrollo, fuente de nitrógeno y exposición a NO. Los genes *FHG1*, *FHG2* y *FHG3* responden transcripcionalmente a NO exógeno. Esta inducción de la transcripción por exposición a NO es una respuesta esperada para genes que codifican componentes esenciales de mecanismos de detoxificación de NO. No obstante, cada uno de ellos muestra un patrón de expresión específico y diferencial. Cuantitativamente la respuesta de *FHG1* a NO es la más intensa, sólo se produce en la fase de germinación de los microconidios y no está sometida a represión metabólica por presencia de amonio en el medio de cultivo. *FHG1* no se expresa en la fase de desarrollo del micelio, ni en ausencia ni en presencia de NO. *FHG2* también responde transcripcionalmente a NO y solo lo hace de forma clara en la fase de germinación de los microconidios, fase en la que la presencia de amonio tampoco bloquea la inducción de la expresión en respuesta a NO. Cabe pensar que ambos genes están implicados, en este estadio de desarrollo, en un mecanismo de defensa inducible en respuesta a NO, el cual es independiente de la presencia de amonio, y que las enzimas codificadas participan en la detoxificación del NO al que las esporas del hongo son expuestas.

En la fase de crecimiento *FHG2* muestra un patrón de expresión diferente, con niveles máximos en medio mínimo con glucosa y en ausencia de fuente de nitrógeno. Durante esta fase la expresión de *FHG2* está reprimida en presencia de amonio. Sorprendentemente,

esta represión se mantiene aún en presencia de NO. Es decir, en la fase de micelio, *FHG2* muestra respuestas transcripcionales que sugieren que participa en procesos específicos de esta etapa de desarrollo, probablemente más relacionadas con el metabolismo del nitrógeno en general que con una respuesta específica de defensa frente a NO.

FHG3 muestra un patrón de expresión similar en esporas y en micelio y con una respuesta a la exposición a NO muy limitada. Sí muestra una respuesta a amonio, cuya presencia estimula su expresión durante la germinación de las esporas, estimulación que no se observa en los genes *FHG1* y *FHG2*. Por lo tanto, *FHG3* también muestra respuestas que sugieren una posible participación en metabolismo del nitrógeno en general, no específicamente en detoxificación de NO. Sin embargo, la respuesta observada no deriva de una posible represión metabólica por presencia de amonio sino, más bien al contrario, de estimulación de la expresión en presencia de esta fuente de nitrógeno. *FHG4* no se expresa a niveles detectables en ninguna de las condiciones consideradas. Teniendo en cuenta que todas estas condiciones son aerobias y dada la presencia de señales de localización mitocondrial en la proteína deducida, es posible proponer que *FHG4* participa en procesos relacionados con desnitrificación y con eliminación de NO específicos del metabolismo mitocondrial. Estas variadas respuestas transcripcionales sugieren que la disponibilidad de cuatro genes *FHG* puede proporcionar a *F. oxysporum* una notable versatilidad metabólica en la utilización de fuentes de nitrógeno, la cual puede resultar útil en determinadas condiciones ambientales.

Se ha comprobado que las cepas FOP-SP1 y FOP-SP4 son sensibles a NO y que la exposición a NO exógeno determina una reducción moderada en la eficiencia de germinación de microconidios en ambas cepas, lo que supone que éste altera o modula la actividad de componentes esenciales para que se produzca la germinación de los microconidios. Esta sensibilidad es superior en la estirpe poco patógena FOP-SP4 que en la muy patógena FOP-SP1. Utilizando el método de transformación mediada por *A. tumefaciens* (ATM) se han obtenido mutantes nulos en los genes *FHG* en ambas cepas del patógeno. La evaluación del comportamiento de los distintos mutantes en condiciones de estrés nitrosativo en medios con amonio o nitrato indica que los mutantes $\Delta FHG1$ y $\Delta FHG2$ son hipersensibles a NO, resultados que demuestran que las flavohemoglobinas *FHG1* y *FHG2* juegan un papel importante en la detoxificación de NO en *F. oxysporum* y que son las responsables de mantener la concentración de NO en el interior de la célula dentro de unos niveles compatibles con el normal funcionamiento del metabolismo celular. Los mutantes $\Delta FHG1$ muestran una mayor sensibilidad a NO exógeno que los mutantes

$\Delta FHG2$, lo que indica que FHG1 tiene una contribución más relevante en la detoxificación de NO exógeno que FHG2. Los mutantes $\Delta FHG3$ y $\Delta FHG4$ no muestran hipersensibilidad a NO en las condiciones evaluadas, lo que sugiere que FHG3 y FHG4 no desempeñan un papel importante en la detoxificación de NO exógeno.

La caracterización fisiológica de los mutantes ΔFHG demuestra que en la eliminación de los niveles de NO que afectan a los componentes de la maquinaria celular implicada en el programa de germinación juega un papel fundamental la enzima FHG1, ya que en los mutantes $\Delta FHG1$ lo que en realidad se produce es un bloqueo de la germinación, no un retraso. Este bloqueo se observa en las dos cepas de *F. oxysporum* y en presencia de una u otra fuente de nitrógeno. El hecho de que este bloqueo se produzca en cepas que poseen alelos de tipo silvestre para los otros tres genes *FHG* supone que FHG1 es responsable específicamente de eliminar el NO que afecta a estos componentes esenciales de la maquinaria de germinación y que su función no es asumida, o compensada, ni siguiera parcialmente, por alguna de las otras tres enzimas FHG de *F. oxysporum*. En medios de cultivo con nitrato, pero no con amonio, la exposición a NO sí determina una reducción en la eficiencia de germinación de los mutantes $\Delta FHG2$, si bien de menor magnitud que la observada en los mutantes $\Delta FHG1$. Una hipótesis que explica estos resultados consiste en que FHG2 es responsable de detoxificar NO que afecta a la germinación, NO que no puede detoxificar FHG1 y que tiene que ver con el metabolismo del nitrato en los mutantes $\Delta FHG2$. Por su parte, el análisis de los mutantes correspondientes demuestra que las flavohemoglobinas FHG3 y FHG4 no juegan un papel importante en la eliminación del NO que afecta a la germinación de los microconidios en FOP-SP1 y en FOP-SP4.

La mayor sensibilidad que las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4 muestran frente a NO exógeno encaja con un papel activo de esta molécula en la respuesta defensiva de la judía frente a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Si es así, la pérdida de la capacidad para detoxificar NO por parte de los mutantes $\Delta FHG1$ y $\Delta FHG2$ debería suponer una disminución de la capacidad de los mismos para eliminar el NO que la planta huésped produce durante el establecimiento y progreso de la interacción. Cabría esperar entonces una disminución en la agresividad de las cepas mutantes ΔFHG sobre su huésped. Sin embargo, se ha comprobado que la delección de los genes *FHG* no altera la capacidad de infección de las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4. Por lo tanto, asumimos que los genes *FHG* no tienen un efecto destacable en la patogenicidad de *F. oxysporum* y concluimos que las enzimas FHG no pueden ser consideradas como factores de virulencia en este hongo fitopatógeno. El hecho de que los mutantes muestren el mismo comportamiento que las cepas de tipo

silvestre durante la interacción nos lleva a considerar que, o bien los niveles de NO producidos durante la interacción con el huésped no son lo suficientemente elevados como para limitar el progreso del patógeno o bien *F. oxysporum* dispone de otros sistemas de detoxificación de NO.

Ciertamente las enzimas FHG de *F. oxysporum* no parecen jugar un papel esencial en el establecimiento de la interacción entre el patógeno y su huésped. La consideración de la existencia de varias copias de genes codificadores de FHG, de la regulación diferencial de la expresión de unos y otros en respuesta a distintos estímulos, entre ellos la fase de desarrollo, la fuente de nitrógeno y la exposición a NO, y de la información derivada de la caracterización fisiológica de los mutantes alterados en la producción de flavohemoglobinas, permiten relacionar la función de estas enzimas más bien con procesos metabólicos básicos, esencialmente procesos relacionados con el metabolismo del nitrógeno, que condicionan a su vez procesos de desarrollo esenciales, como la germinación de los microconidios. La disponibilidad de varias enzimas FHG puede conferir ventajas adaptativas en condiciones ambientales y de acceso a nutrientes muy diversas, contribuyendo a proporcionar a *F. oxysporum* una versatilidad metabólica muy notable.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Hongos fitopatógenos

A nivel mundial los hongos fitopatógenos constituyen un grupo de microorganismos ubicuo y extremadamente versátil, de nutrición heterótrofa y ocupan la mayor parte de los ecosistemas terrestres. La mayoría de las más de 100.000 especies conocidas de hongos son saprofitos estrictos, es decir, viven sobre una matriz de tejido orgánico muerto al que ayudan a descomponerse. Muchos de ellos son macroscópicos y algunos también comestibles. Aproximadamente 10% (8.000 especies) del total de especies de hongos conocidas son capaces de colonizar tejidos vegetales y sólo una fracción menor es capaz de producir enfermedades en las plantas (Schäfer, 1994; Knogge, 1996a).

A pesar de tratarse de un número restringido de especies, los patógenos fúngicos tienen un gran impacto en la economía mundial. Según estimaciones de la FAO, la agricultura mundial pierde cada año el 12% de su producción por daños causados por hongos fitopatógenos, más que por cualquier otro agente. Estos daños se producen a pesar de la masiva utilización de fungicidas cuyo mercado global supera anualmente los 20.000 millones de dólares.

1.2 El género *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un amplio y heterogéneo grupo de hongos ascomicetos (clase Sordariomycetes, orden Hipocreales, familia Nectriaceae), con amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista económico. Incluye numerosas especies, la mayoría de ellas patógenas de plantas capaces de causar marchitez vascular en un gran número de cultivos y producir toxinas letales para algunos animales (Michielse and Rep, 2009). *Fusarium* también produce una gran cantidad de metabolitos secundarios tóxicos como tricotecenos y fumonisinas que pueden contaminar productos agrícolas. Algunos de ellos como los tricotecenos pueden también actuar como factores de virulencia en enfermedades de plantas (Baayen *et al.*, 2000; Desmond *et al.* 2008). También incluye estirpes no patógenas, saprófitas y parásitas de otros organismos, incluido el ser humano (Ortoneda *et al.*, 2004; O`Donnell *et al.*, 2007). Algunas especies pueden completar el ciclo sexual, mientras que la mayoría presentan reproducción asexual. Debido a las graves

pérdidas económicas originadas por la infección con esta especie, y a la facilidad para su cultivo y manejo en el laboratorio, ha suscitado un gran interés en el estudio de los mecanismos de infección de este patógeno de raíz, convirtiéndose en un excelente modelo de experimentación para conocer el proceso de patogénesis. Además, recientemente se han desarrollado diversas herramientas genómicas que mejoran la investigación en esta especie, entre las que destacan la completa secuenciación y anotación del genoma de *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* y diversas formas especiales del complejo de especies de *Fusarium oxysporum* por el Broad Institute (<https://www.broad.mit.edu/annotation>) (Ma *et al.*, 2010).

1.2.1 Morfología

Los hongos del género *Fusarium* son haploides y producen macroconidios característicos en forma de huso: hialinos, alargados y septados y en la mayoría de las especies se producen en una estructura denominada esporodoquio. También producen microconidios y estructuras de resistencia denominadas clamidosporas. Booth lo describió en 1982 como un género con esporas asexuales hialinas, septadas y con una célula basal muy característica por la estructura de “tacón”. Es posible realizar una identificación morfológica para la determinación de especies, centrada en la forma y en el tamaño de los macro y microconidios, las hifas y la formación y disposición de las clamidosporas (Booth *et al.*, 1984).

1.2.2 Taxonomía del género *Fusarium*

Dada su importancia como patógeno y su complejidad taxonómica, el género *Fusarium* sigue siendo objeto de numerosas clasificaciones. En 1809, Link realizó una primera clasificación morfológica centrada en la forma de los conidios, que describió como “fusiformes y hialinos”. En 1841, Fries incluyó al género dentro del orden Tuberculariaceae. Casi un siglo después, en 1935, Wollenweber y Reinking dividieron el género en 11 secciones, 65 especies, 55 variedades y 22 *formae speciales*. Gerlach y Nirenberg (1982), así como Nelson *et al.* (1983) desarrollaron un sistema taxonómico basado también en características morfológicas. En 1990, Nelson distinguió 14 especies.

En la actualidad, se han descrito alrededor de 150 especies morfológicas y/o filogenéticamente diferentes bien caracterizadas y aceptadas por los taxónomos (Seifert y Lévesque, 2004), subdivididas en 16 secciones (Nelson *et al.*, (1994). Cada sección es un

complejo de especies relacionadas entre sí. Las secciones en las que se divide el género *Fusarium* son: *Eupionnotes*, *Macroconia*, *Spicarioides*, *Submicrocera*, *Pseudomicrocera*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Letritium*, *Liseola*, *Elegans*, *Martiella*, *Ventricosum*.

Según Leslie & Summerell (2006), la clasificación de *Fusarium* sería la siguiente:

División	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión	<i>Pezizomycota</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Subclase	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Nectriaceae</i>
Género	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. solani</i> etc.

Los marcadores moleculares se han convertido en importantes herramientas que permiten estimar la variabilidad genética, realizar estudios filogenéticos y de diagnóstico molecular. Cabe destacar la utilización de isoenzimas (Laday y Szecsi, 2002), de RAPD (*random amplified polymorphism DNA*) (Voigt *et al.*, 1995; Alves-Santos *et al.*, 2002a), el análisis de las regiones intergénicas espaciadoras del ARN ribosómico (ITS e IGS) mediante RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (Appel y Gordon, 1995; Alves-Santos *et al.*, 2002a; Mirete *et al.*, 2003), la comparación de secuencias codificadoras de copia única ricas en intrones, tales como los genes codificadores de la calmodulina, la β -tubulina, la histona H3 o el gen *EF-1 α* (Guadet *et al.*, 1989; Gordon y Martyn, 1997) y, más recientemente, los microarrays de ADN (Lievens *et al.*, 2003). Muchas de las especies de *Fusarium* descritas en los últimos años han sido descubiertas gracias a técnicas de análisis filogenéticos (O'Donnell *et al.*, 1998; Benyon *et al.*, 2000; O'Donnell, 2000; Suga *et al.*, 2002; Tan y Niessen, 2003). Recientemente se ha creado una base de datos. Muchas de las especies de *Fusarium* descritas en los últimos años han sido descubiertas gracias a técnicas de análisis filogenéticos (O'Donnell *et al.*, 1998; Benyon *et al.*, 2000; O'Donnell, 2000; Suga *et al.*, 2002; Tan y Niessen, 2003). Actualmente el EF-1 α es considerado como el gen esencial en análisis multigénicos por las siguientes razones: 1) La presencia de una única copia en el genoma de *Fusarium*, 2) la no detección de copias ortólogas, 3) su riqueza de regiones intrónicas y alto nivel de polimorfismo entre especies estrechamente cercanas

y 4) la posibilidad de generar cebadores universales, que permiten realizar estudios filogenéticos del género (Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2004).

1.2.3 Especies anamórficas y teleomórficas del género *Fusarium*

La clasificación según el tipo de reproducción se considera más descriptiva que taxonómica. En algunas especies se han descrito sus estados teleomórficos o de reproducción sexual conocida (Seifert y Gams, 2001). Así las formas anamórficas y teleomórficas de este género se han clasificado juntas o en el grupo de basidiomicetes o en el de ascomicetes y parecen formar un grupo monofilético (Samuels y Blackwell, 2001). En las especies del género de las que se conoce su estado teleomórfico, como *F. solani*, *F. graminearum* o *F. verticilloides* (*Nectria haematococca*, *Giberella zeae*, y *Giberella fujikuroi*, respectivamente), se produce la fusión de los núcleos que da lugar a un núcleo diploide que entrará posteriormente en meiosis. Las bases genéticas que controlan los mecanismos de reproducción sexual en los ascomicetos filamentosos han sido esclarecidas en los últimos años. Los encargados de regular la reproducción sexual son los productos de los genes que determinan el tipo apareante ("mating type", MT), que consisten en un locus con dos alelos funcionales, a menudo designados como MAT-1 y MAT-2 (Yoder *et al.*, 1986; Glass *et al.*, 1990; Kerenyi *et al.*, 2004; Hornok *et al.*, 2007; Keszthelyi *et al.*, 2007). Estos genes determinan la habilidad de dos cepas para fusionar sus núcleos y formar una célula diploide (Nelson, 1996; Coppin *et al.*, 1997).

En las formas anamórficas del género *Fusarium* en las que no ocurre la meiosis, que es el principal mecanismo generador de intercambio genético, deben existir otros mecanismos que permitan la adquisición de variabilidad genética. En *F. oxysporum* se han descrito fenómenos de intercambio genético como la heterocariosis y la parasexualidad (Burnett, 1984) y la actividad de elementos transponibles o transposones (Daboussi y Capy, 2003), duplicaciones, deleciones y transposiciones (Kistler *et al.*, 1995). La heterocariosis es la fusión de hifas sin cariogamia. Los individuos resultantes de este proceso se denominan heterocariontes vegetativos por ser estables cuando se mantienen por un periodo de tiempo indefinido. De esta forma los hongos que son haploides pueden obtener ciertos beneficios propios de la diploidía y si dos cepas son capaces de formar un heterocarionte vegetativo pertenecerán a un mismo grupo de compatibilidad vegetativa o VCG (*vegetative compatibility group*). Si, por el contrario, tras la fusión de las hifas se produce la lisis celular, estas estirpes se consideran incompatibles (Leslie, 1993; Glass *et al.*, 2000). Los VCG han sido utilizados por numerosos autores para estudiar la variabilidad intra-específica del

género (Puhalla, 1985; Ploetz *et al.*, 1988; Woo *et al.*, 1996; Alves-Santos *et al.*, 2002a). En los heterocariontes vegetativos no se descarta que se produzcan fenómenos de intercambio genético, conocido como parasexualidad, que es un tipo de intercambio que ha sido observado en cepas de *F. oxysporum*, dando como resultado reorganizaciones cromosómicas y recombinación (Teunissen *et al.*, 2002).

1.3 El complejo de especies *F. oxysporum*

1.3.1 Descripción y características taxonómicas

F. oxysporum Schlechtend.:Fr. es un complejo de especies anamórficas con considerable variación morfológica y fisiológica, las cuales están distribuidas por todos los suelos del mundo. Son capaces de crecer saprofiticamente o colonizar un hospedero (planta o animal), de reproducción asexual, con hifas hialinas y septadas, y sin ciclo sexual conocido. Las cepas patógenas colectivamente podrían parasitar más de 100 hospederos diferentes (Michielse y Rep, 2009). *F. oxysporum* es un patógeno del suelo, que se ha convertido en un excelente modelo de experimentación puesto que ofrece la doble posibilidad de estudiar tanto el proceso de infección de estos patógenos en plantas como en pacientes inmunodeprimidos (Ortoneda *et al.*, 2004).

Uno de los problemas más importantes para el estudio de la biología de *F. oxysporum* es la dificultad de definir qué es una población al no existir criterios morfológicos que permitan la diferenciación a nivel intra-específico. Para intentar ordenar y explicar toda esta variabilidad se utiliza el concepto de formas especiales.

La nomenclatura utilizada para designar a las formas especiales es un trinomio en latín, con el nombre de la especie seguido de una referencia al hospedero que parasitan. Distintos investigadores han propuesto que los aislados que atacan a una determinada especie de huésped representan un grupo monofilético natural. Datos recientes demuestran que dentro de algunas formas especiales de *F. oxysporum* (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) existen aislados de orígenes independientes (Kistler, 2001). Por lo tanto la asociación de determinadas cepas con un hospedador no implica necesariamente un origen monofilético.

Las formas especiales son cepas morfológicamente indistinguibles que se caracterizan por su adaptación a diferentes hospederos (Deighton, *et al.*, 1962). Serían, por lo tanto, un

conjunto de cepas que atacan a una especie vegetal o a lo sumo a varias especies de un mismo género. Aunque también este concepto se usa para definir cepas que producen una patología diferente aunque parasiten a la misma especie vegetal. Esta definición se refiere fundamentalmente a capacidades fisiológicas del hongo y no tiene un valor taxonómico, pero tradicionalmente ha sido un concepto útil para los fitopatólogos (Gordon y Martyn, 1997). Originalmente se aceptó que las formas especiales patogénicas de *F. oxysporum* se habían originado a partir de formas especiales no patogénicas o saprófitas en procesos evolutivos muy largos, principalmente en los centros de origen de las plantas hospedantes (Nelson, 1990). Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre aislados han demostrado que la capacidad para infectar una especie vegetal ha surgido independientemente varias veces a lo largo de la evolución (Baayen *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 1998). Este fenómeno se relaciona con la existencia de cromosomas específicos presentes exclusivamente en el genoma de determinadas estirpes, que son portadoras de genes relacionados con patogénesis que confieren especificidad para el hospedador (Ma *et al.*, 2010). En la tabla 1 se muestran algunas formas especiales representativas del género *Fusarium*.

Tabla 1. Grupo representativo de formas especiales del complejo de especies de *F. oxysporum*

<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>asparagi</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>tulipae</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>batatas</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>tuberosi</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>strigae</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cyclaminis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ricini</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>herbemontis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pisi</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>betae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cannabis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>passiflorae</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>palmarum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>citri</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>nicotianae</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>coffea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>narcissi</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>quitoense</i>

1.3.1.1 Morfología

F. oxysporum forma un micelio de textura algodonosa que puede variar de color, desde blanco a rosa pálido hasta un púrpura intenso, según el aislado. Las condiciones ambientales, es una variable que afectan la velocidad de crecimiento, así como la forma, tamaño y abundancia de esporas y número de septos de sus hifas (Agrios, 1997). *F. oxysporum* produce tres tipos de esporas asexuales: microconidios, macroconidios y clamidosporas. Los microconidios, con una o dos células, son los más abundantes. Se producen con mayor frecuencia y en cualquier circunstancia y presentan formas ovaladas y cilíndricas. Los macroconidios son las esporas típicas del género pero las menos abundantes, de aspecto fusiforme, septadas, constituidas por 2 a 5 células, puntiagudas e inclinadas hacia los extremos. Las clamidosporas se forman por la tabicación y engrosamiento de una parte de una hifa. Presentan una forma esférica y con pared engrosada y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo dependiendo de las condiciones ambientales (Nelson, 1981; Agrios, 1997).

1.3.1.2 Ciclo de vida

F. oxysporum tiene un ciclo de vida complejo que podría dividirse en dos fases, una como parásito dentro de un hospedero específico y otra de crecimiento saprofítico (Figura 1). La fase saprófita empieza cuando los tejidos infectados de la planta comienzan a morir. El hongo produce clamidosporas cuando los niveles de nutrientes empiezan a disminuir en el tejido moribundo y son liberadas al suelo junto a restos de hifas cuando la planta muere (Beckman, 1987).

Las clamidosporas permanecen en estado de dormancia durante largos periodos de tiempo en condiciones ambientales desfavorables (Price, 1984). Si las condiciones son favorables para el hongo pueden germinar y el hongo comenzará su fase de vida saprofita. La germinación de las clamidosporas se produce en presencia de restos vegetales o un huésped apropiado. La persistencia de clamidosporas y micelio en zonas relativamente profundas del suelo dificulta la tarea de erradicar la enfermedad de los cultivos, por lo que resulta de gran importancia el desarrollo de tratamientos y técnicas agrícolas para minimizar la presencia de inóculo en el suelo. Ante la proximidad de las raíces y señales quimio-atrayentes producidas por exudados de las raíces el estado de dormancia de las clamidosporas es interrumpido y el hongo colonizará la planta pudiendo infectar al hospedero y entrar en la fase parásita, o bien, si el huésped no es el apropiado, continuar

como saprofita (Beckman, 1987). Recientes estudios demuestran que las peroxidases producidas por los exudados de raíces tienen actividad quimio-atrayente para la orientación del crecimiento de *F. oxysporum* hacia las raíces de la planta (Turrá *et al.*, 2015)

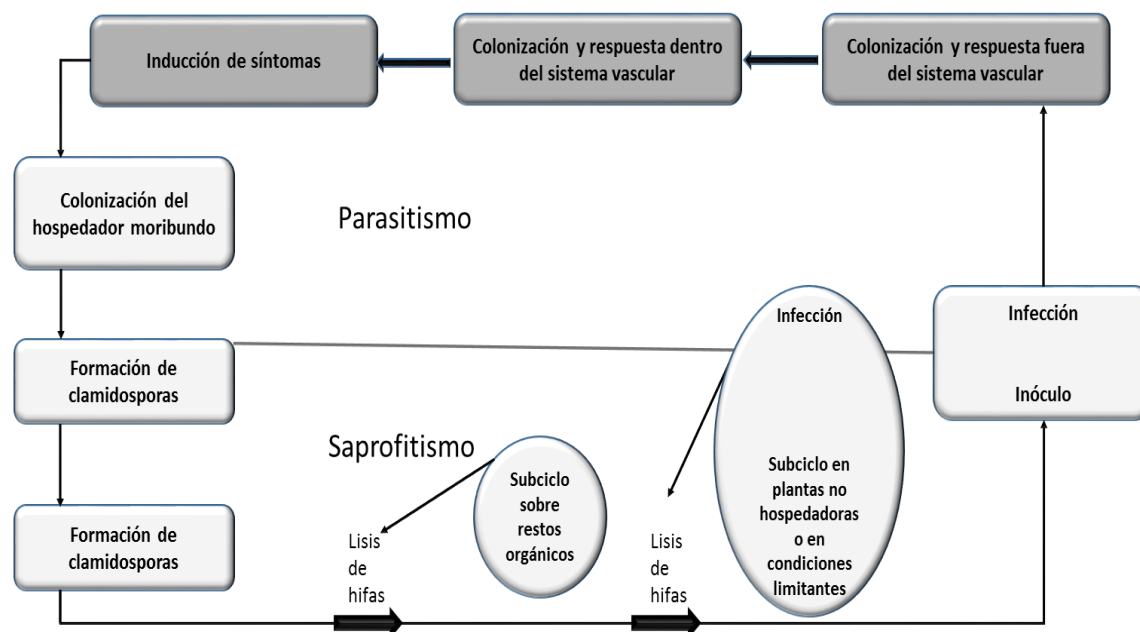


Figura 1. Ciclo de vida de *F. oxysporum* (Beckman, 1987).

1.3.1.3 Capacidad infectiva: la fusariosis vascular

El desarrollo de la enfermedad es el resultado de la interacción del hongo con la planta según una secuencia de etapas que pueden resumirse en seis (Schäfer, 1994; Knogge, 1996b), algunas de las cuales son comunes al proceso de infección de hongos fitopatógenos en general (Schäfer, 1994).

1. Reconocimiento de las raíces de su hospedador mediante señales químicas producidas por la planta.
2. Adherencia de las hifas a la superficie de la raíz y posterior entrada.
3. Penetración en el córtex radicular y degradación de barreras físicas (endodermis) para alcanzar el tejido vascular.
4. Superación de las barreras defensivas de la planta para penetrar en las células del xilema.
5. Proliferación de las hifas en el xilema y producción de microconidios que germinarán y propagarán la infección.
6. Secreción de pequeños péptidos o fitotoxinas que potencian la virulencia.

Las etapas iniciales del proceso de infección se han podido visualizar mediante microscopía confocal empleando la proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein) en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Di Pietro *et al.*, 2001a) y *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Niño-Sánchez *et al.*, 2015). En este último sistema ha sido posible realizar el seguimiento del proceso de infección en raíz y tallo de judía, observándose desde las primeras etapas de infección diferencias entre aislados patógenos y no patógenos (Niño-Sánchez *et al.*, 2015).

F. oxysporum es capaz de detectar la presencia de una planta hospedadora incluso antes de establecer un contacto físico. Esto se debe a que los exudados de las raíces producen peroxidases que son sustancias quimio-atrayentes que ponen en funcionamiento las rutas de transducción de señales del hongo y éste responde mediante la activación de los genes apropiados que regulan los mecanismos de patogenicidad (Turrá *et al.*, 2015). Actualmente se conocen dos tipos de rutas: la cascada de la adenosina monofosfato-proteína quinasa A (AMPc-PKA) y la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Di Pietro *et al.*, 2001).

Los hongos patógenos emplean diferentes mecanismos para unirse a la superficie de la planta hospedadora. En cualquier caso, la penetración del hongo en la planta precisa del contacto y la adhesión de las esporas y/o de la primera hifa que resulta de su germinación (tubo germinativo) a la superficie vegetal, formándose una densa red de hifas que parece necesaria para iniciar la penetración (Czymmek *et al.*, 2007; Olivain and Alabouvette, 1999; Rodríguez-Gálvez y Mendgen, 1995). Estudios de microscopía electrónica ha demostrado la ausencia de estructuras especializadas de penetración en *F. oxysporum* (Olivain and Alabouvette, 1999; Niño-Sánchez *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha identificado la formación de hifas que penetran a través de heridas, aberturas naturales o penetración directa a través de los tejidos intactos de la epidermis de la raíz y la formación de un septo en el punto de penetración (Pareja Jaime *et al.*, 2010; Pérez-Nadales and Di Pietro, 2011; Niño-Sánchez *et al.*, 2015).

Por otro lado, *F. oxysporum* debe adaptarse al ambiente hostil del interior de la planta, para lo cual activa su maquinaria de ataque mediante la producción de enzimas que degradan la pared celular vegetal, como poligalacturonasas, pectinasas, xilanasas y proteasas (Rispaill *et al.*, 2009), la producción de enzimas que degradan los compuestos tóxicos de las plantas, como tomatinasas y lacasas, y el refuerzo de su pared celular para resistir los daños causados por estas sustancias tóxicas (Cañero and Roncero, 2008; Pareja-Jaime *et al.*, 2008). Después de superar las defensas del hospedero, *F. oxysporum* invade la corteza

radical creciendo por los espacios inter e intracelulares alcanzando los vasos del xilema a través de orificios y utilizándolos como avenidas para crecimiento de hifas y transporte de microconidios para colonizar el tallo y las partes aéreas de la planta (Pastor-Corrales and Abawi, 1987; Agrios, 1997).

En el estadio de plántula, los vegetales infectados por *F. oxysporum* pueden marchitarse y morir poco tiempo después de la aparición de los primeros síntomas. En plantas de mayor edad aparecen el atrofiamiento y amarilleo de las hojas inferiores, la formación de raíces adventicias, la marchitez de las hojas y tallos más jóvenes, la defoliación, la necrosis marginal de las hojas restantes y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 1997). La infección generalmente se desplaza en sentido ascendente a través de la planta, siendo el oscurecimiento del tejido vascular un síntoma característico de la marchitez.

1.3.1.4 Genes esenciales en patogenicidad y virulencia de *F. oxysporum*

Las estrategias de genética directa y reversa han permitido la identificación de genes de patogenicidad en especies del género *Fusarium*. Dos clases de genes de patogenicidad han sido propuestos **(1)** genes de patogenicidad básica que son compartidos por especies del género *Fusarium* y otros hongos, y **(2)** genes de patogenicidad específicos del género *Fusarium* sobre hospederos específicos (Michielse and Rep, 2009; Kazan *et al.*, 2012).

Los genes de patogenicidad básicos detectan señales endógenas y exógenas, como las proteínas quinasas activados por mitógenos (MAPK) (Di Pietro *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2002; Urban *et al.*, 2002), proteínas RAS (pequeñas GTPasas), proteínas G (Wiemann *et al.*, 2010), componentes del complejo velvet (*LaeA/VeA/VeIB*) (Lee *et al.*, 2012;), las proteínas quitin sintasas *CHS1*, *CHS2*, *CHS7* (Martin-Urdíroz *et al.*, 2008), *CHSV* (Pareja-Jaime *et al.*, 2010) y los componentes de la vía cAMP (adenosina monofosfato cíclico). A menudo, las mutaciones de estos genes afectan también a la morfología (García-Martínez *et al.*, 2012).

Los genes especializados de patogenicidad están involucrados directamente en la interacción patógeno-planta hospedadora. Así, en *F. oxysporum* han sido identificados varios genes codificadores de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular (CWDE) como endo y exopoligalacturonasas, pectinasas, xilanasas, proteasas y pectato liasa cuyos productos génicos juegan papeles importantes en las fases de penetración y

colonización de la raíz (Beckman, 1987; Di Pietro *et al.*, 2003). Importantes progresos se han realizado en la identificación de factores especialmente requeridos para patogenicidad, entre los que podemos citar los genes *SIX1* y *SIX6* (Houterman *et al.*, 2008; Niño *et al.*, 2015), los genes *FMK1* y *ARG1*, que controlan pasos claves en la patogénesis de *F. oxysporum* (Namiki *et al.*, 2001) y los factores de transcripción *FOW2* en *F. oxysporum* f. sp. *melonis* y *SGE1* en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, específicamente requeridos para patogenicidad. Los mutantes de ambos genes pierden completamente la patogenicidad sobre su hospedero (Imazaki *et al.*, 2007) (*SGE1* también está involucrado en la producción de microconidios).

Los estudios realizados por nuestro grupo muestran que la familia de reguladores transcripcionales FTF es fundamental para la virulencia y el patrón de colonización vascular en *F. oxysporum*. Las distintas copias funcionales de *FTF1* codifican el regulador maestro de una serie de efectores (genes *SIX*) cuyo concurso es fundamental para una elevada agresividad en la colonización de la planta infectada (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). Además, el patrón de colonización de los mutantes silenciados en *FTF* es muy parecido al que muestran las estirpes poco virulentas (Niño-Sánchez *et al.*, 2015), las cuales carecen de las copias de *FTF1* (Ramos *et al.*, 2007).

En la Tabla 2 se resumen los genes caracterizados en *F. oxysporum* que son esenciales en la colonización y patogenicidad del hospedero. En muchos casos, los genes con un efecto significativo sobre la patogénesis han resultado ser los que regulan la expresión de un conjunto de otros genes. Entre ellos, se encuentran los que intervienen en la transducción de señales o los responsables de factores de transcripción.

Tabla 2. Genes de patogenicidad y virulencia identificados en *F. oxysporum* (tomado de Michielse and Rep, 2009).

Gene	Función	Efecto inactivación	Referencia
<i>AGR1</i>	Arginosuccinato liasa	Reducción virulencia	Namiki <i>et al.</i> , 2001
<i>CHS1</i>	Quitin sintasa Clase I	Reducción Virulencia	Martin-Urdíroz <i>et al.</i> , 2008
<i>CHS2</i>	Quitin sintasa Clase II	Reducción virulencia	Martin-Urdíroz <i>et al.</i> , 2008
<i>CHS7</i>	Proteína como chaperona	Reducción virulencia	Martin-Urdíroz <i>et al.</i> , 2008
<i>CHSV</i>	Quitin sintasa Clase 7	Reducción virulencia	Pareja-Jaime <i>et al.</i> , 2010
<i>CLC1</i>	Canal de cloruro	Reducción virulencia	Canero and Roncero, 2008b
<i>CTF1</i>	Factor transcripción	Full virulencia	Rocha <i>et al.</i> , 2008
<i>CTI6</i>	Factor transcripción	Reducción virulencia	Michielse <i>et al.</i> , 2009

<i>DCW1</i>	Proteína de pared celular	Reducción virulencia	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>FCD1</i>	Quinona-celobiosa	Full virulencia	Kawabe <i>et al.</i> , 2006
<i>EBR1</i>	Factor transcripción	Reducción virulencia	Zhao <i>et al.</i> , 2011
<i>FGA1</i>	Subunidad α proteína G	Reducción virulencia	Jain <i>et al.</i> , 2002
<i>FGA2</i>	Subunidad α proteína G	Resistencia a shock térmico	Jain <i>et al.</i> , 2005
<i>FGB1</i>	Subunidad β proteína G	Reducción virulencia	Jain <i>et al.</i> , 2003
<i>FMK1</i>	Proteína quinasa	Afecta colonización raíz	Di Pietro <i>et al.</i> , 2001a
<i>FNR1</i>	Factor de transcripción	Reducción virulencia	Divon <i>et al.</i> , 2006
<i>FOW1</i>	Transportador mitocondrial	Reducción virulencia	Inoue <i>et al.</i> , 2002
<i>FOW2</i>	Factor de transcripción	Afectado en el crecimiento	Imazaki <i>et al.</i> , 2007
<i>FPD1</i>	Regulador de transporte cloruro	Reducción virulencia	C.B. Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>FRP1</i>	Proteína F-box	Afecta colonización y penetración	Duyvesteijn <i>et al.</i> , 2005
<i>FSO1</i>	Fusarium so1	Fusión de hifas	Rosales and Di Pietro, 2008
<i>FTF1</i>	Factor de transcripción	Reducción virulencia	Ramos <i>et al.</i> , 2007
<i>GAS1</i>	B-1,3-glucanosyltransferasa	Reducción virulencia	Caracuel <i>et al.</i> , 2005
<i>ICL1</i>	Isocitrato liasa	Full virulencia	Jonkers <i>et al.</i> , 2009
<i>LCC1</i>	Lacasa	Full virulencia	Cañero and Roncero, 2008a
<i>LCC3</i>	Lacasa	Full virulencia	Cañero and Roncero, 2008a
<i>LCC5</i>	Lacasa	Full virulencia	Cañero and Roncero, 2008a
<i>PacC</i>	Factor de transcripción	Incrementa la virulencia	Caracuel <i>et al.</i> , 2003
<i>PEX12</i>	Peroxina	Full virulencia, reduce crecimiento saprofítico	Di Pietro y Roncero, 1998
<i>PEX26</i>	Peroxina	Reduce virulencia	Michielse <i>et al.</i> , 2009
<i>PG1</i>	Endopoligalacturonasa	Full virulencia	Di Pietro y Roncero, 1998
<i>PG5</i>	Endopoligalacturonasa	Full virulencia	Garcia-Maceira <i>et al.</i> , 2000
<i>PGX4</i>	Endopoligalacturonasa	Full virulencia	Garcia-Maceira <i>et al.</i> , 2000
<i>PL1</i>	Pectato liasa	Full virulencia	Huertas-González <i>et al.</i> , 1999
<i>PRT1</i>	Serín proteasa	Full virulencia	Di Pietro <i>et al.</i> , 2001
<i>REN1</i>	Factor transcripción	Full virulencia, no produce macro y microconidios	Ohara <i>et al.</i> , 2004
<i>RH01</i>	Proteína G	Reducción virulencia	Martínez-Rocha <i>et al.</i> , 2008

<i>RHR1</i>	Factor transcripción	Uso de fuente carbono	Pardo y Orejas, 2014
<i>SGE1</i>	Factor transcripción	Reduce conidiación	Michielse <i>et al.</i> , (no publicado)
<i>SIX1</i>	Secreción de pequeñas proteínas	Full virulencia	Rep <i>et al.</i> , 2005
<i>SIX6</i>	Secreción de pequeñas proteínas	Reducción virulencia	Gawehns <i>et al.</i> , 2014
<i>SNF1</i>	Proteína quinasa	Reducción virulencia	Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 2003
<i>STI35</i>	Biosíntesis tiamina	Full virulencia	Ruíz-Roldan <i>et al.</i> , 2008
<i>STUA</i>	Factor transcripción	Full virulencia	Ohara y Tsuge, 2004
<i>TOM1</i>	Enzima tomatinasa	Reducción virulencia	Pareja-Jaime <i>et al.</i> , 2008
<i>WC1</i>	Fotoreceptor	Full virulencia	Ruíz-Roldan <i>et al.</i> , 2008b
<i>XLNR</i>	Factor transcripción	Full virulencia	Calero-Nieto <i>et al.</i> , 2008
<i>XYL3</i>	Endoxylanasa 10	Full virulencia	Gómez -Gómez <i>et al.</i> , 2002
<i>XYL4</i>	Endoxylanasa 11	Full virulencia	Gómez -Gómez <i>et al.</i> , 2002
<i>XYL5</i>	Endoxylanasa 11	Full virulencia	Gómez -Gómez <i>et al.</i> , 2001

1.4 Genómica de *F. oxysporum*: genoma nuclear y genoma adaptativo, expansiones génicas.

En la actualidad la disponibilidad de secuencias completas de 11 genomas del género *Fusarium*, así como la disponibilidad de mapas genéticos y físicos completos, proporcionan una excelente oportunidad para la identificación de nuevos genes implicados en procesos de patogenicidad y virulencia, así como en la producción de micotoxinas de importancia médica e industrial. Se ha comprobado que las distintas especies de *Fusarium* varían en el tamaño de sus genomas y en el número de cromosomas (Ma *et al.*, 2013). En *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se han identificado 15 cromosomas que componen un genoma nuclear de 61 Mb. *F. verticillinoides* cuenta con 11 cromosomas que componen un genoma nuclear de 42 Mb y *F. graminearum* con 4 cromosomas y un genoma nuclear de 36 Mb (Ma *et al.*, 2013). El genoma de *F. oxysporum* es el más grande de todos los genomas de *Fusarium* analizados y presentan una identidad del 91 % con el genoma de *F. verticillinoides*, y del 85 % con el genoma de *F. graminearum* (Ma *et al.*, 2013).

La identificación de cromosomas supernumerarios provee clara evidencia de la compartimentalización del genoma tanto a nivel funcional y estructural, esencialmente por la división del genoma en dos componentes, **(1)** un genoma central que codifica funciones necesarias para crecimiento y supervivencia y **(2)** un componente accesorio que codifica factores de patogenicidad/virulencia y metabolitos secundarios. Akagi *et al* (2009) reportan

que la transferencia de cromosomas numerarios podría proporcionar un mecanismo para la evolución de la patogenicidad de las especies de *Fusarium* (Han *et al.*, 2001). Esta hipótesis ha sido comprobada experimentalmente sobre *Solanum lycopersicum in vitro* mediante la transferencia de cromosomas supernumerarios entre cepas de *F. oxysporum* (Ma *et al.*, 2010). Probablemente los cromosomas supernumerarios potencien la virulencia específica sobre el hospedero (Han *et al.*, 2001) y pueden haber sido importantes para la adaptación específica a un hospedero determinado dentro del complejo de especies de *F. oxysporum* y la rápida emergencia de nuevos patógenos (Ma *et al.*, 2010). Los cromosomas supernumerarios presentan una serie de características que los hacen particularmente interesantes en este contexto: (1) carecer de genes constitutivos involucrados en procesos metabólicos secundarios, (2) presentar altos contenidos de Guanina y Citosina (G+C), (3) carecer de sintenia con especies relacionadas y (4) contener un gran número de elementos transponibles (Jonkers *et al.*, 2014) que probablemente fueron obtenidos por vía de transferencia horizontal. Los cromosomas transferidos lateralmente de una cepa patógena a una cepa no patógena pueden convertir a la cepa no patógena en patógena (Ma *et al.*, 2010).

El 40 % del genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* está estructurado por cromosomas extras conocidos como regiones LS-Fol (específicos del linaje de Fol) que son diferentes a los cromosomas del genoma central. Las regiones LS-Fol incluyen los cromosomas 3, 6, 14 y 15, y partes del cromosoma 1 (parte 27) y cromosoma 2 (parte 31) y en conjunto alcanzan un tamaño de 19 Mb. La región LS-Fol contiene más del 74 % de elementos transposables. Alrededor del 28 % de todo el genoma de Fol contiene secuencias repetitivas, incluido muchos retro-transposones como las secuencias LINES (elementos nucleares dispersos largos) y SINES (elementos nucleares dispersos cortos) (Ma *et al.*, 2010).

1.5 *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

F. oxysporum f. sp. *phaseoli* es el agente causal de la marchitez vascular de plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y está presente en todos los cultivos de judías en el mundo (Pastor-Corrales and Abawi, 1987; Alves-Santos *et al.*, 2002b). La inadecuada rotación de cultivos, especialmente en áreas de irrigación con central pivotante, y la falta de medidas de control de la diseminación del patógeno han convertido a la marchitez vascular producida por *Fusarium* en judía en una de las enfermedades más importantes económicamente en el mundo sobre este cultivo (Pastor-Corrales and Abawi, 1987). La

primera descripción de la fusariosis vascular de la judía la realizó Harter en 1928 en California (Harter, 1929; revisado en Aloj *et al.*, 1983) y la caracterización del patógeno la llevaron a cabo Kendrick y Snyder (Kendrick y Snyder, 1942).

1.5.1 Sintomatología y clasificación

La sintomatología de la enfermedad es típica de la marchitez vascular producida por *F. oxysporum*, con la aparición de procesos de amarilleamiento, clorosis y decaimiento. El hongo penetra por la raíz y el hipocótilo a través de heridas y aberturas naturales y se multiplica en el tejido vascular de la planta hasta que lo colapsa. Aunque la temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad es de unos 20°C, el máximo desarrollo micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ocurre a 28 °C (Hagedorn, 1991). Al igual que en otras formas especiales, en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* es posible establecer una clasificación en «razas» en función de la capacidad patogénica de los aislados sobre una serie de variedades diferenciales de judía (Aloj *et al.*, 1987; Gordon and Martyn, 1997; Alves-Santos *et al.*, 2002a). Hasta el momento se han identificado 7 razas: Ribeiro and Hagerdon describieron en 1979 la raza 1 en Carolina del Sur (EEUU) y en Brasil la raza 2 (Ribeiro and Hagerdon, 1979). La raza 3 se descubrió en Colombia (Pastor-Corrales and Abawi, 1987), la raza 4 en Colorado EE.UU. (Salgado and Schwartz, 1993), la raza 5 en Grecia (Woo *et al.*, 1996) y las razas 6 y 7, las últimas descritas hasta el momento, en aislados procedentes de España y Grecia, respectivamente (Alves-Santos *et al.*, 2002a).

1.5.2 La importancia del cultivo de la judía

La judía (*Phaseolus vulgaris* L.), pertenece a la familia *Leguminosae*, es autógama y de germinación epigea. La temperatura óptima de crecimiento está entre los 15.6 y 21.1 °C (Michaelis, 1991). Las variedades cultivadas son herbáceas anuales, de crecimiento determinado, y sus semillas presentan una gran variabilidad en cuanto a tamaño, forma y color según las variedades. Constituyen un alimento de bajo coste y rico en proteínas y carbohidratos. Los registros arqueológicos más antiguos datan del 8.000 a.C. en Perú, y de 7.000 a.C. en México, y parecen indicar que la domesticación se produjo en estas dos regiones del continente americano: la región andina y la región mesoamericana (Michaelis, 1991). La judía fue introducida en España y Portugal desde los primeros viajes al continente americano, y los estudios del patrón de faseolinas parecen indicar que provienen de cultivares situados en Chile (Gepts and Bliss, 1988). Los mayores productores de judía a nivel mundial son Brasil y la India con unas 3.000.000 toneladas anuales. La producción

en España en el 2004 alcanzó las 17.700 toneladas y la superficie cultivada unas 11.100 ha (FAOSTAT, 2004), representando el 15 % de la producción en la Unión Europea. Entre las variedades más valoradas se encuentran las judías de “El Barco de Ávila”, como la Riojana o Blanca Riñón, la Blanca Redonda, la Plancheta o Planchada, la Morada Larga, la Morada Redonda, el Judión del Barco y la Arroquina.

El problema sanitario más importante del cultivo de la judía en “El Barco de Ávila” es la Fusariosis Vascular (Díaz-Mínguez *et al.*, 1996), también denominado “quema” o “rastrajera”. La marchitez vascular no es una enfermedad nueva y su importancia económica ya fue reconocida en 1926 cuando se hizo un estudio acerca de los daños causados en las cosechas de judías de esta zona (Benlloch and Cañizo, 1926). Probablemente los suelos ácidos, la abundancia de agua para el riego y las labores culturales tradicionales son los que han favorecido la gran incidencia de la enfermedad en esta comarca.

Por la importancia económica y alimentaria de este cultivo nuestro grupo de investigación se interesó en el estudio de este patógeno en cultivos de judía de esta zona desde hace 20 años mediante inspecciones sistemáticas y periódicas de campos de judías de los alrededores de “El Barco de Ávila” y de los pueblos colindantes de la comarca (La Carrera, Solana de Ávila, Navalanguilla, Tormellas, Bohoyo, Los Llanos del Tormes, etc.). En aquellos casos en los que se detectaron plantas con síntomas, se tomó como muestra generalmente la planta completa. *In situ* pudo observarse que los amarilleamientos y la marchitez estaban acompañados por decoloraciones de los haces vasculares que afectaban al tallo de la planta enferma en grados distintos.

A partir de las muestras recolectadas se purificaron más de 140 aislados de *F. oxysporum*. Muchos de ellos resultaron no ser patógenos, como confirmaron los resultados de los ensayos de infección de dos variedades de judía «Blanca Riñón» y «Blanca Redonda», mientras que algunos reprodujeron en infecciones contraladas en condiciones de laboratorio los mismos síntomas de la enfermedad detectados en campo (Díaz-Mínguez *et al.*, 1996). En función de los resultados obtenidos los aislados pueden subdividirse en dos grupos según su grado de virulencia y el índice de progreso de enfermedad según la escala CIAT (van Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987): estirpes muy virulentas y estirpes poco virulentas. Los datos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que los aislados procedentes de “El Barco de Ávila” se encuentran entre los más virulentos de los analizados hasta ahora en todo el mundo. De hecho, su comportamiento patogénico

parecía diferente al de otros aislados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Woo *et al.*, 1996), lo que finalmente indicó que estos aislados constituyen una nueva raza, la raza 6 de FOP (Alves-Santos *et al.*, 2002a). Además de poseer una amplia colección de aislados (no patógenos, patógenos poco virulentos y patógenos muy virulentos) muy bien caracterizadas fisiológica y genéticamente (Alves-Santos, 1999), disponemos también, fruto de análisis previos, de marcadores moleculares de tipo RAPD que permiten distinguir entre aislados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* patógenos y no patógenos (Alves-Santos *et al.*, 2002a). En la Tabla 3 se muestran las estirpes obtenidas de cultivos de judía en la comarca de “El Barco de Ávila” consideradas como representativas de los grupos indicados.

Tabla 3. Estirpes representativas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* aislados de cultivos de judía de la comarca de “El Barco de Ávila”.

Cepa	Origen	Patogenicidad	Año	Raza	VCG
*FOP-SP1	El Barco de Ávila	Muy virulento	1993	6	0167
FOP-SP2	El Barco de Ávila	Muy virulento	1996	6	0167
FOP-SP3	El Barco de Ávila	Muy virulento	1996	6	0168
*FOP-SP4	El Barco de Ávila	Poco virulento	1994	6	0166
FOP-SP5	El Barco de Ávila	Poco virulento	1994	6	0166
FOP-SP6	El Barco de Ávila	Poco virulento	1994	6	0166
FOP-SP7	El Barco de Ávila	Poco virulento	1995	6	0166
FOP-SP8	El Barco de Ávila	Poco virulento	1995	6	0166
FOP-SP9	Navalonguilla	Poco virulento	1994	6	0166
AB82	El Barco de Ávila	NO patógeno	1995	-	0167
AB92	El Barco de Ávila	No patógeno	1995	-	0167
AN6	Navalonguilla	No Patógeno	1994	-	1

* Estirpes utilizadas en este trabajo.

1.6 El óxido nítrico

1.6.1 Descripción

El óxido nítrico (NO) es una molécula formada por dos átomos, un átomo de oxígeno (O) y otro de nitrógeno (N). El oxígeno tiene 6 electrones y el nitrógeno tiene 7 electrones; cuando estos dos átomos reaccionan entre sí, sus electrones se aparean para formar una molécula de NO•, que contiene un electrón desapareado. La presencia del electrón desapareado

permite al NO• interactuar rápidamente con otros átomos que son abundantes en los sistemas biológicos, tales como el Nitrógeno (N) y el azufre (S) que forman parte de las proteínas. La reacción del NO con las proteínas u otras moléculas se llama nitración y este proceso le confiere actividad fisiológica (Stamler *et al.*, 1992).

El NO también reacciona con átomos metálicos como el hierro (Fe), el cual forma parte de proteínas que se conocen como ferroproteínas o hemoproteínas, fundamentales en la regulación de un gran número de funciones biológicas y la generación de señales químicas intracelulares. Por otro lado, el NO reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O₂) y con los radicales libres superóxido (•O₂⁻) e hidroxilo (•OH), los cuales son sumamente tóxicos (Stamler *et al.*, 1992).

1.6.2 Funciones fisiológicas del NO

El NO es una molécula pequeña, con una vida media de 5 segundos, que difunde libremente a través de la membrana plasmática. Por estas razones, alcanza rápidamente las moléculas que se encuentran en el interior de la célula, a diferencia de las proteínas y algunas hormonas que regulan la fisiología celular. La complejidad en la acción de estas moléculas requiere de receptores en la superficie celular para poder entrar o salir, no así en el caso del NO, cuyas propiedades químicas lo convierten en un excelente mediador de respuestas celulares produciendo una amplia gama de efectos biológicos. Por ello, la síntesis y regulación del NO es de suma importancia para el organismo. El NO, además de ser producido en los vasos sanguíneos de los mamíferos, también se sintetiza en los macrófagos, células inmunes que responden ante la agresión por algunos agentes patógenos (MacMicking *et al.*, 1997). En otros sistemas biológicos se produce por diversos mecanismos. Así, las enterobacterias y las bacterias denitrificantes pueden sintetizarlo mediante sistemas enzimáticos sencillos, tales como la nitrato y nitrito reductasa (Spiro, 2007). Las plantas también lo producen a través de la nitrato reductasa cuando las concentraciones intracelulares de nitrito son muy elevadas (Meyer *et al.*, 2005).

En humanos, el NO cumple varias funciones fisiológicas: actúa como neurotransmisor, tiene actividad vasodilatadora, es estimulante de la síntesis de músculo liso vascular, inhibe la actividad plaquetaria, participa en la génesis de enfermedades como hipertensión y en el shock séptico y colabora en la regulación del reclutamiento de células inflamatorias dentro de la pared vascular, entre otras (Vallance and Collier, 1994; Court *et al.*, 2002). El NO también es generado por macrófagos y neutrófilos como parte de la respuesta inmune,

y resulta tóxico para bacterias y patógenos humanos (Ignarro, 1990; Napoli *et al.*, 2009). En plantas el NO está implicado en varios procesos fisiológicos tales como la resistencia a enfermedades, estrés abiótico, muerte celular, respiración, senescencia, desarrollo de la raíz y germinación de semillas, entre otras (Freschi *et al.*, 2010; Zafra *et al.*, 2010; Besson-Bard *et al.*, 2008). En hongos el NO participa en varias funciones fisiológicas como desarrollo asexual de esporas, formación de cuerpos de fructificación, supresión de la formación de pseudomicelio y germinación de microconidios. A pesar de la importancia del NO en una gran variedad de procesos fisiológicos fúngicos, sus mecanismos de actuación son en gran parte todavía desconocidos (Samalova *et al.*, 2012).

1.6.2.1 Síntesis de NO en animales, plantas y hongos

En animales, la biosíntesis de NO está catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS), la cual oxida L-arginina a L-citrulina con producción de NO (Moncada *et al.*, 1991). Se han identificado tres isoformas de NOS: dos constitutivas, NOS neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS), implicadas en el control de la vasodilatación y en la neurotransmisión, respectivamente, y cuya actividad está controlada por la concentración de Ca^{2+} (Stuehr, 1999; Alderton *et al.*, 2001). Existe una tercera NOS de expresión inducible (iNOS), cuya actividad no es afectada por Ca^{2+} pero sí controlada por hormonas peptídicas producidas en respuesta a infecciones (Macmicking *et al.*, 1995). Las enzimas NOS requieren para su activación de cofactores como la flavina mononucleótido (FMN), flavina adenina dinucleótido (FADH) y tetrahidrobiopterina (BH₄). Todas las NOS poseen dos dominios: oxigenasa (con un centro hemo) y reductasa (contiene sitios de unión para NADPH, FAD y FMN). Ambos dominios están conectados por un sitio de unión a calmodulina (Alderton *et al.*, 2001).

En plantas, a diferencia de lo que sucede en sistemas animales, existen varios mecanismos de producción de NO. Estos pueden dividirse en dos grupos de acuerdo al sustrato implicado: (1) producción de NO a partir de L-arginina, y (2) producción de NO a partir de nitrato (NO_3). La existencia de enzimas de tipo NOS en plantas ha sido analizada mediante el uso de anticuerpos anti-NOS de animales (Kuo *et al.*, 1995), la detección de la actividad NOS en extractos vegetales (Cueto *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1999; Simontacchi *et al.*, 2004) y mediante el uso de inhibidores específicos (Cueto *et al.*, 1996, Bright *et al.*, 2006, Valderrama *et al.*, 2007). A nivel subcelular, la actividad NOS ha sido asociada a peroxisomas (Corpas *et al.*, 2001), cloroplastos (Jasid *et al.*, 2006), mitocondrias (Kaiser *et al.*, 2006) y citoplasma (Ribeiro *et al.*, 1999). Sin embargo, a pesar de los indicios

acumulados sobre la existencia de NOS en plantas, aún no se ha identificado la proteína responsable de esta actividad.

La actividad de la enzima nitrato reductasa (NR) sí ha sido identificada como una fuente importante de producción de NO en plantas. Klepper (1990) reportó que durante tratamientos con herbicidas, las plantas de soja alteradas en la NR emitían menores niveles de NO que plantas de tipo silvestre. La capacidad de la NR para producir NO a partir de nitrito y NADH es más importante cuando las plantas se someten a condiciones de anoxia (Rockel *et al.*, 2002).

La producción no-enzimática de NO a partir de formas oxidadas del nitrógeno también parece ocurrir en plantas. Los pigmentos carotenoides son capaces de producir NO a partir de NO₂, en una reacción dependiente de la luz (Cooney *et al.*, 1994). Además, se ha observado generación de NO a partir de nitrito en el apoplasto de células de la aleurona bajo condiciones reductoras y a un pH de 5,5 (Bethke *et al.*, 2004). Parecería ser que la contribución de las distintas fuentes de NO en plantas dependería de la especie, célula o tejido involucrado, y de las condiciones de crecimiento y fisiológicas de la planta (Neill *et al.*, 2003).

La información disponible sobre la síntesis de NO en hongos patógenos es muy limitada, pero existen evidencias experimentales que demuestran que los hongos del género *Aspergillus* spp. (*A. niger*, *A. flavus* y *A. oryzae*) y *Glomerella graminicola* obtienen NO a través de una vía dependiente de L-arginina usando un complejo sistema “NOS-like” (Lapp *et al.*, 2014). Existen evidencias de síntesis de NO dependiente de la L-arginina en mutantes de *Coniothyrium minitans* que muestran defectos en la conidiación; estas alteraciones se corrigen cuando se suministra a los mutantes L-arginina o NO, lo cual sugiere que se requiere la oxidación de L-arginina a NO para la conidiación (Gong *et al.*, 2007). En concordancia con este fenotipo, los inhibidores NOS de mamíferos provocan reducción de los niveles de NO celular y retraso y reducción de la conidiación (Gong *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). La actividad NOS-like ha sido evaluada en otras especies de hongos con inhibidores anti-NOS de mamíferos como L-NAME y 1-[2-(trifluorometil) fenil]-imidazole). La presencia de L-NAME inhibe la actividad de NOS y suprime la síntesis de NO en *Saccharomyces cerevisiae* (Kanadia *et al.*, 1998), *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeianus* (Li *et al.*, 2010), *Trichoderma harzianum* (Samolski *et al.*, 2009), en el hongo acuático *Blastocladiella emersonii* (Vieira *et al.*, 2009), en *Blumeria graminis* (Prats *et al.*, 2008) y en *Colletotrichum coccodes* (Wang and Higgins, 2005). Sin embargo, la presencia

de L-NAME en cultivos de *Botrytis cinerea* no afecta a la producción de NO (Turi3n-G3mez *et al.*, 2011). Samalova *et al.* (2012) demostraron que *Magnoprote oryzae* no utiliza la v3a dependiente de NOS y tampoco la v3a dependiente de la NR para la s3ntesis de NO end3geno. Recientemente se ha demostrado que en *A. nidulans* la enzima NR est3 implicada en la s3ntesis de NO (Marcos *et al.*, 2016).

1.6.2.2 NO en la interacci3n planta-pat3geno

Cuando la c3lula vegetal detecta la presencia de un pat3geno, se activa una potente reacci3n de defensa inducida conocida como respuesta hipersensible (HR). La HR es m3s severa en el tejido que est3 directamente en contacto con el pat3geno y m3s flexible en los tejidos no infectados de la planta (Mur *et al.*, 2008). B3sicamente este tipo de reacci3n permite potenciar las barreras, tanto qu3micas como estructurales, que los tejidos vegetales mantienen en forma constitutiva. Uno de los procesos activados durante esta respuesta defensiva es la producci3n de altas concentraciones de potentes agentes oxidantes como las especies reactivas de ox3geno (ROS). Adem3s, la planta produce altas concentraciones de otras hormonas como etileno, 3xido n3trico (NO), 3cido jasm3nico y sus derivados (JA), y otros antibi3ticos o fitoalexinas (Belenghi *et al.*, 2007). Como producto de la acci3n de la HR se activa el mecanismo de muerte celular denominado muerte celular programada o apoptosis ampliamente estudiado en mam3feros. El concepto fue desarrollado a principios del siglo XX (Stakman, 1915) y desde entonces ha sido extensamente estudiado (Mur *et al.*, 2008).

La muerte de c3lulas vegetales inducida durante la HR depende de la producci3n de NO y de especies reactivas de ox3geno (Delledonne *et al.*, 2001). En sistemas animales, el NO reacciona con el an33n super3xido ($O_2^{\cdot -}$), resultando en la formaci3n del peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual es altamente t3xico para c3lulas de mam3feros y puede resultar en apoptosis o da3os celulares (Bonfoco *et al.*, 1995). En el caso de sistemas vegetales, el $O_2^{\cdot -}$ se transforma en H_2O_2 por medio de la super3xido dismutasa (SOD) durante la HR, reaccionando el NO con el H_2O_2 para producir $ONOO^-$ (Delledonne *et al.*, 2001). Las concentraciones de $ONOO^-$ entre 1 y 1000 μM son t3xicas para c3lulas animales, provocando la muerte celular (Lin *et al.*, 1995). Sin embargo, las c3lulas vegetales muestran una gran resistencia a $ONOO^-$, ya que se ha demostrado que las suspensiones de c3lulas de soja resisten hasta 1 mM de $ONOO^-$ (Delledonne *et al.*, 2001). Asimismo, los mutantes de *A. thaliana* carentes del gen de la peroxiredoxina II E (PrxII E), la cual detoxifica $ONOO^-$ en planta, no muestran diferencias en muerte celular con el tipo silvestre tanto en

muestras sin tratamiento como en muestras tratada con 3 mM de ONOO⁻ (Romero-Puertas *et al.*, 2007).

La familia de proteínas caspasas actúa en la regulación de los programas de muerte celular de mamíferos (Martin and Green, 1995). Las caspasas están inactivadas en células sanas y se activan durante condiciones de estrés o infección, produciéndose la liberación de citocromo C desde las mitocondrias, el cual interacciona con la proteína codificada por *Apaf1* para activar la cascada de caspasas (Adams and Cory, 2002). Los genomas de plantas no contienen homólogos a las caspasas, pero se pueden encontrar proteínas similares como las metacaspasas, cuya actividad en *Arabidopsis* está regulada por NO mediante la S-nitrosilación (Belenghi *et al.*, 2007). Las metacaspasas, responsables de la señalización en los programas de muerte celular (Chichkova *et al.*, 2004), son insensibles al NO cuando están maduras, aunque pueden permanecer inactivas mediante S-nitrosilación (Belenghi *et al.*, 2007).

El óxido nítrico tiene efectos en el crecimiento y desarrollo de la planta, en buena medida en interacción con otras hormonas, y regula procesos relacionados con la muerte celular programada, con el cierre estomático y con la germinación de la semillas, (Cevahir *et al.*, 2007). Los mecanismos en los que afecta el NO a los procesos de transducción de señales implican proteínas de señalización clave como proteínas quinasas y canales permeables de Ca²⁺, así como la movilización de mensajeros secundarios que incluyen Ca²⁺, cAMP y cADPR (Courtois *et al.*, 2008). La S-nitrosilación consiste en la unión covalente de una molécula de NO al grupo tiol de la cisteína (Mannick and Schonhoff, 2002) y constituye el aspecto más extendido y funcionalmente importante de la modificación postranscripcional por NO (Hess *et al.*, 2005). Es un proceso reversible, recuperándose los grupos tiol de la cisteína y formándose S-nitrosoglutatión (GSNO) gracias a la actividad en *A. thaliana* de la GSNO reductasa 1 (AtGSNOR1), la cual está a su vez implicada en la protección contra patógenos (Feechan *et al.*, 2005). La peroxiredoxina, PrxIIIE, es responsable de la degradación de ONOO⁻. Sin embargo el NO es capaz de autorregular sus propios radicales mediante la desactivación de proteínas como la PrxIIIE (Romero-Puertas *et al.*, 2007).

1.6.3 Fuentes de nitrógeno utilizadas por los hongos.

Los organismos vivos dependen de nitrógeno, ya que es un elemento integral de numerosas moléculas necesarias para la vida, como aminoácidos, ácidos nucleicos o

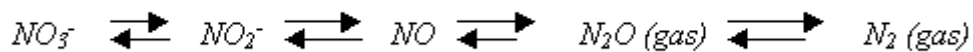
proteínas. Cuando se dispone de nitrógeno reducido todas las vías involucradas en la asimilación de fuentes alternativas, incluida la vía de asimilación de nitrato, sufren un proceso de regulación negativa. Esta regulación es particularmente evidente en los hongos. En base al efecto que tienen sobre el metabolismo del nitrógeno se puede distinguir entre fuentes de nitrógeno preferidas, que desencadenan la regulación negativa del catabolismo de compuestos alternativos de nitrógeno, o no preferidas (Magasanik and Kaiser, 2002). La glutamina es una de las fuentes nitrogenadas preferidas por excelencia. Se trata de un producto final de la confluencia entre las vías metabólicas del carbono y del nitrógeno y a partir de ella la célula puede sintetizar biomoléculas tan importantes como aminoácidos, purinas, pirimidinas. Además, la velocidad de crecimiento de la mayoría de los microorganismos asimiladores en un medio con glutamina como única fuente de nitrógeno es superior a la detectada en medios con otras fuentes de nitrógeno menos reducidas (Magasanik, 2002). Otra fuente preferida es el amonio que puede incorporarse a los esqueletos carbonados, procedentes del ciclo de Krebs, reaccionando con el α -cetoglutarato dando lugar a glutamato por acción de la glutamato deshidrogenasa, o reaccionando directamente con el glutamato para generar glutamina por acción de la glutamina sintetasa. Sin embargo en ausencia de las fuentes primarias de nitrógeno varias fuentes alternativas o secundarias de nitrógeno como nitrato, purinas, aminoácidos y aminas, pueden ser utilizados por los organismos una vez que las fuentes primarias se han agotado (Cove, 1970; Marzluf, 1997; Wong, *et al.*, 2008). La llamada represión catabólica por nitrógeno es la responsable de que la célula no sintetice permeasas y enzimas exclusivas para la asimilación y metabolismo de fuentes de nitrógeno no preferidas, evitando el gasto innecesario de energía por parte de la célula (Marzluf, 1997; Magasanik, 1992; Magasanik, 2005; Godard *et al.*, 2007). En los hongos filamentosos la regulación del catabolismo del nitrógeno está mediada por los factores GATA, *AreA* y *Nit2*. Se trata de reguladores positivos que median la señal de desrepresión activando la expresión de los genes del catabolismo del nitrógeno en ausencia de fuentes de nitrógeno preferidas (Kudla *et al.*, 1990; Minehart and Magasanik, 1991; Marzluf, 1997). La señal de desrepresión es contrarrestada en el momento en el que una fuente preferente de nitrógeno vuelve a estar presente en el medio (Dunn-Coleman *et al.*, 1981; Xiao *et al.*, 1995; Andrianopoulos *et al.*, 1998). Los mutantes deficientes del gen *areA* son incapaces de utilizar otras fuentes de nitrógeno que no sea amonio o L-glutamina (Kudla *et al.*, 1990).

Las enzimas y permeasas que controlan la vía catabólica del nitrógeno requiere de dos señales positivas: (1) La detección de ausencia de fuentes primarias de nitrógeno como amonio y L-glutamina (desrepresión), y (2) la expresión solamente de las enzimas de una

vía catabólica específica de muchos candidatos potenciales dentro del circuito regulatorio del nitrógeno (ejemplo nitrato o nitrito). Para el metabolismo del nitrato o nitrito se necesita la acción sinérgica de *AreA* y *NirA* (Narendja, 2002; Berger 2006). Por otro lado, *NirA* es un factor de transcripción específico de la vía y actúa de manera cooperativa con *AreA* mediando la activación transcripcional del grupo de genes implicados en la asimilación del nitrato (Bernreiter, *et al.*, 2007).

1.6.4 La desnitrificación del nitrato en procariotas

La desnitrificación anaerobia es un proceso respiratorio alternativo en procariotas en ausencia de O_2 . Durante este proceso las procariotas reducen nitratos (NO_3^-) a nitritos (NO_2^-), óxido nitroso (N_2O) y dinitrógeno (N_2) (Zumft, 1997), mediante cuatro reacciones catalizadas por las enzimas nitrato reductasa (Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente (Shoun *et al.*, 1992; Zumft, 1997). La mayoría de las especies de organismos desnitrificantes son facultativos, con posibilidad de emplear oxígeno o nitrato y nitrito como aceptor final de electrones. La producción energética (ATP) a partir de nitrato y nitrito es menor que la obtenida a partir de oxígeno, y mayor que la obtenida a partir de la reducción de sulfato.



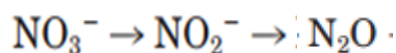
La reducción de NO_3^- está acoplada a la producción de ATP, lo que permite a la célula crecer en ausencia de O_2 . La capacidad de desnitrificar está muy extendida entre varias subclases de proteobacterias y en las arqueobacterias (Zumft, 1997). Aunque la desnitrificación es una característica propia de las bacterias anaerobias facultativas, y se considera que sólo ocurre en ausencia de O_2 , se han descrito algunas especies del género *Paracoccus* capaces de desnitrificar en condiciones aeróbicas (Shoun *et al.*, 1992).

La capacidad desnitrificante también está presente en hongos ascomicetes, zygomycetes, Basidiomycetes y hongos imperfectos, favoreciendo la capacidad de adaptación de estos organismos a ambientes pobres en oxígeno (Ronald y Laughlin, 2002).

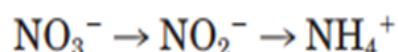
1.6.5 Desnitrificación y producción de NO en *F. oxysporum*

Los cambios rápidos en la disponibilidad de oxígeno constituyen un desafío permanente para muchos organismos que viven en el suelo. Las bacterias anaerobias facultativas pueden adaptarse inmediatamente a los rápidos cambios en la concentración de oxígeno, mediante la alteración de su metabolismo energético (Takaya *et al.*, 2002). Por el contrario, se sabe mucho menos acerca de los mecanismos adaptativos en eucariotas, aunque muchos eucariotas inferiores pueden sobrevivir en condiciones anóxicas. La mayoría de estos eucariotas anaerobios se han adaptado de forma permanente a ambientes extremos (Takaya *et al.*, 2002).

F. oxysporum fue el primer eucariota en el cual se demostró actividad desnitrificadora en condiciones anaerobias (Shoun and Tanimoto, 1991), la cual fue posteriormente encontrada en otros organismos del grupo (Shoun *et al.*, 1992), tales como *A. oryzae* y *Cylindrocarpon tonkinense*. Estos hongos muestran actividad desnitrificante reduciendo nitrato y nitrito a nitrógeno gaseoso (Shoun, 1992; Nakanishi *et al.*, 2010). En *F. oxysporum* la desnitrificación se realiza a través de la conversión del nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2), catalizada por la nitrato reductasa, y de éste a óxido nitroso (N_2O), reacción catalizada por la nitrito reductasa (Zhou *et al.*, 2001). *F. oxysporum* no tiene actividad óxido nitroso reductasa, por lo que el óxido nitroso (N_2O) resultante se liberaría al ambiente, a diferencia de lo que ocurre en bacterias, las cuales liberan nitrógeno gaseoso. La conversión de nitrito a óxido nitroso tiene lugar en dos fases, una primera en la cual el nitrito se convierte en óxido nítrico, y una segunda en la cual éste se convierte en óxido nitroso. De esta forma, la actividad desnitrificante constituye un mecanismo de producción de NO. La reducción del NO a óxido nitroso depende de una forma única de nitrito reductasa (nor), la P450-nor. Aunque en un principio se pensó que esta actividad constituía un mecanismo de detoxificación de NO, en realidad el sistema desnitrificante de *F. oxysporum* está localizado en las mitocondrias, acoplado a la cadena de transporte de electrones, por lo que permite a la célula respirar anaeróbicamente y producir ATP bajo hipoxia, (Kobayashi *et al.*, 1995), de la misma forma que ocurre en bacterias. Estudios realizados por Zhou *et al.* (2001) demostraron que los cultivos suplementados con NO_3 como única fuente de nitrógeno y expuesto a condiciones limitantes de O_2 mostraron concentraciones elevadas de óxido nitroso (N_2O) en relación con la cantidad de NH_4 . En altas concentraciones de O_2 no se detectó la presencia de NH_4 y tampoco de N_2O . En la siguiente reacción se muestra el proceso de la desnitrificación desasimilatoria del nitrato en *F. oxysporum*.



También se ha demostrado que, en condiciones anaeróbicas, se puede producir desnitrificación asimilatoria o fermentación del amonio, es decir, la reducción del NO_3^- a NO_2^- y de éste a amonio (NH_4^+) en ausencia absoluta de oxígeno (O_2). La fermentación del amonio se lleva a cabo por las enzimas nitrato reductasa (Nar) y nitrito reductasa (Nir), obteniéndose como producto final el amonio (NH_4^+), que es introducido en los esqueletos de las cadenas carbonadas (Zhou *et al.*, 2002). La evidencia obtenida muestra que *F. oxysporum* es capaz de adaptarse a la presencia de condiciones variables de oxígeno. En ausencia completa de oxígeno tiene lugar la fermentación del amonio, la cual es reemplazada por la desnitrificación disimilatoria a medida que se incrementa el aporte de oxígeno, hasta llegar a una respiración totalmente aerobia cuando la presencia de oxígeno es suficiente (Zhou *et al.*, 2002). En la siguiente reacción se muestra el proceso de la desnitrificación asimilatoria o fermentación del amonio en *F. oxysporum*.



El metabolismo asimilatorio o fermentación del amonio fue evaluado en 17 cepas de hongos más o menos relacionados con *F. oxysporum*, cultivados en ausencia de O_2 (anoxia). Los resultados mostraron que 15 de ellas eran capaces de convertir el nitrato en amonio en ausencia de O_2 (Zhou *et al.*, 2002).

1.7 Las flavohemoglobinas

1.7.1 Origen de las flavohemoglobinas

Las flavohemoglobinas forman parte de la superfamilia de las globinas que emergieron a partir de un dominio globina de un antecesor bacteriano (Vinogradov *et al.*, 2005). La superfamilia de las globinas está dividida en tres linajes (Vinogradov *et al.*, 2008). En el primer linaje se encuentran las proteínas flavohemoglobinas (FHG's) formada por un dominio hemoglobina N-terminal que reversiblemente se une al O_2 y un dominio activo redox C-terminal con potenciales sitios de unión para FAD y NAD(P)H. Estas proteínas están ampliamente distribuidas en bacterias, levaduras y hongos. Su función está

relacionado con la protección a estrés nitrosativo (Poole, 1994). En el segundo linaje se agrupan las globinas con un dominio globina N-terminal acoplado a un dominio de la protoglobina. Estas globinas están ausentes en eucariotas y están distribuidas en arqueobacterias y bacterias (Poole and Hughes, 2000). En el tercer linaje se encuentran las llamadas hemoglobinas truncadas (TrHbs) con un solo dominio globina, que forman parte de una nueva familia de pequeñas proteínas hemoglobina de 20 a 30 aminoácidos y que están ampliamente distribuidas en bacterias y otros organismos (Wittenberg *et al.*, 2002; Vinogradov *et al.*, 2007).

1.7.2 Estructura de las flavohemoglobinas

La proteína flavohemoglobina (hmp) de *Escherichia coli* es la hemoglobina mejor estudiada del grupo de las FHG's. Está formada por dos dominios, cada uno de los cuales es incapaz de detoxificar NO por sí solo, siendo imprescindible para la actividad catalítica de las flavohemoglobinas la actividad de sus dos dominios (Hernandez-Urzuza *et al.*, 2003). Los dos dominios de hmp son (1) el dominio de la globina y (2) el dominio de oxidoreducción subdividido a su vez en dos subdominios independientes estructural y funcionalmente, el primer subdominio de unión a FAD (FAD_binding_6) y el segundo subdominio de unión a NAD (NAD_binding_1). El grupo hemo y el dominio FAD se aproximan a una distancia mínima de 5,9 Å promoviendo la transferencia de electrones de FAD al grupo hemo en un ambiente predominantemente polar dado por varias cadenas de aminoácidos. En el subdominio de unión a FAD se han identificado varios aminoácidos conservados: tirosina (Tyr) 206, glutamato (Glu) 388, glutamina (Gln) 205, arginina (Arg) 204 y serina (Ser) 207 y en el subdominio de unión a NAD el glutamato (Glu) 388 está muy conservado (Gardner *et al.*, 2005). La Figura 2 muestra la estructura tridimensional de la hmp de *E. coli* derivada de datos experimentales obtenidos mediante rayos X (Ilari *et al.*, 2002).

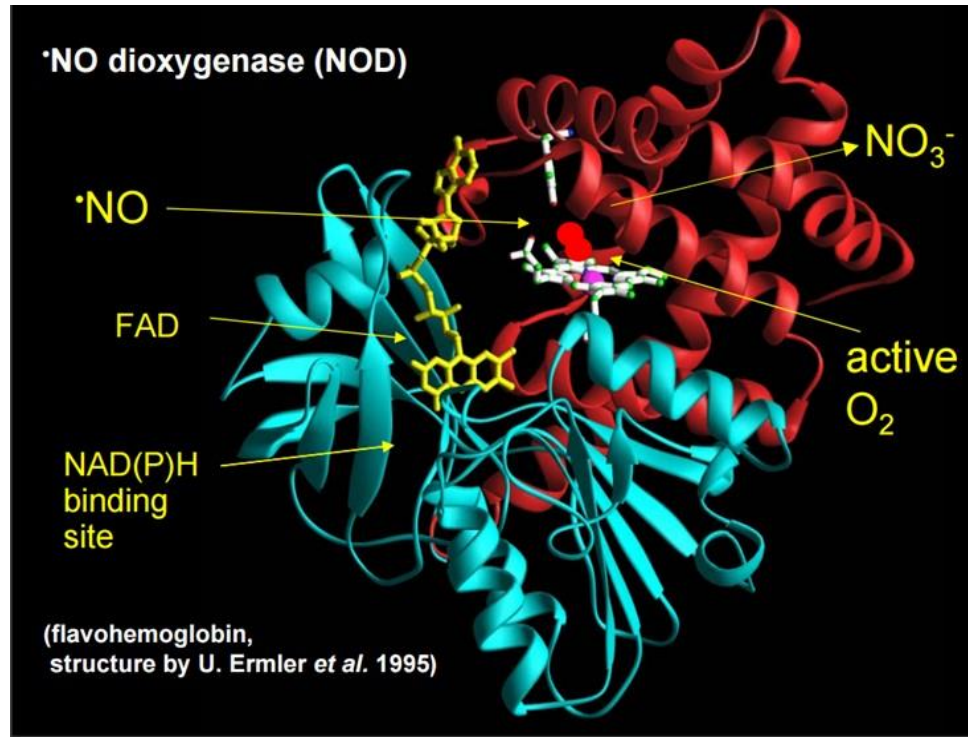


Figura 2. Estructura tridimensional de la flavohemoglobina de *E. coli*. El dominio globina se muestra en color rojo. El dominio de oxidoreducción se representa en color turquesa (Ermler *et al.*, 1995).

1.7.3 Funciones de las flavohemoglobinas.

Las proteínas flavohemoglobinas (FHG's) se encuentran ampliamente distribuidas en microorganismos procariotas y eucariotas. En bacterias las proteínas FHG's están relacionadas con la eliminación del óxido nítrico (NO). En hongos el papel funcional de las flavohemoglobinas aún es una cuestión controvertida (Cassanova *et al.*, 2005; Smagghe *et al.*, 2008). La mayoría de las investigaciones apuntan a que las funciones de las FHG's en hongos están relacionadas con el metabolismo del NO, estrés nitrosativo y oxidativo, señalización celular, germinación, conidiación y desarrollo sexual (Cassanova *et al.*, 2005; Smagghe *et al.*, 2008; Marcos *et al.*, 2016).

1.7.3.1 Respuesta de las flavohemoglobinas al estrés nitrosativo y oxidativo.

El primer gen codificador de una enzima FHG fue identificado en la bacteria *E. coli* (gen *hmp*) (Vasudevan *et al.*, 1991). La caracterización molecular y funcional de la enzima fue planteada una década más tarde, describiéndose como una dioxigenasa de NO dependiente de NADPH, FAD y O_2 , cuya función es proteger a la bacteria del estrés

nitrosativo mediante la conversión del NO en nitrato (NO₃) (Gardner *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 1998). En condiciones aeróbicas el gen *hmp* es inducido por NO (Gardner *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 1998; Membrillo-Hernandez *et al.*, 1998). En condiciones anaeróbicas la flavohemoglobina de *E. coli* consume NO generando N₂O con la participación de NADH (Durner *et al.*, 1999). Los mutantes de la FHG de *E. coli* no sólo acumulan mayor cantidad de NO, sino que son incapaces de producir NO detectable, limitación que se correlaciona con una reducción de la actividad de la enzima nitrito reductasa responsable de la producción de NO (Corker y Poole, 2003).

En la bacteria *Salmonella typhimurium* se ha demostrado que los mutantes deficientes de la flavohemoglobina (*hmp*) son capaces de producir NO tanto aeróbicamente como anaeróbicamente, lo que implica que esta flavohemoglobina interviene en el control de la concentración de NO (Gilberthorpe y Poole, 2008).

En la bacteria *Bacillus subtilis* el gen *hmp* es inducido bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas en respuesta a tratamientos con NO (Moore *et al.*, 2004). Sin embargo, este mismo estudio muestra que la respuesta al estrés del NO gas y del donador SNP son diferentes. A pesar de que ambos tratamientos inducen el regulón $\sigma\beta$, el NO gas lo hace mediante la vía energética y el SNP mediante la vía de estrés ambiental. La diferencia de la respuesta trascricional dependiendo de la fuente de NO ha sido también observada en *S. cerevisiae* (Sarver y DeRisi, 2005). Este fenómeno es debido probablemente a la cantidad de NO liberada por el donador y el tiempo de exposición a NO que tiene cada donador determinado por su vida media (Fitzhugh and Keefer, 2000).

La flavohemoglobina de *S. cerevisiae* (*yhb1*) protege a la levadura del estrés nitrosativo producido por el NO en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. También se ha demostrado que *yhb1* facilita la denitrosilación de proteínas. Se ha comprobado que los mutantes son sensibles a estrés nitrosativo y que muestran un incremento en la concentración de las proteínas S-nitrosiladas al ser comparados con las cepas silvestres (Liu *et al.*, 2000). La flavohemoglobina *yhb1* se localiza en dos compartimentos celulares distintos: el citosol y la matriz mitocondrial (Cassanova *et al.*, 2005). La localización mitocondrial de *yhb1* tiene implicaciones en el control de la cadena respiratoria, ya que el NO que degrada es capaz de inhibir la citocromo C oxidasa y la respiración (Boveris *et al.*, 2000; Szibor *et al.*, 2001) y de reaccionar con el superóxido para formar peroxinitrito (Cadenas *et al.*, 2000). De esta forma, en ausencia de la flavohemoglobina los niveles de NO se incrementan (Liu *et al.*, 2000), se inhibe la citocromo C oxidasa, se incrementa la producción de superóxido y,

consecuentemente, los niveles de peroxinitrito. Así, la levadura puede reducir los niveles de superóxido no sólo mediante la superóxido dismutasa sino reduciendo su formación vía cadena respiratoria al eliminar NO mediante la flavohemoglobina. De este modo, *yhb1* es esencial para la supervivencia de la célula bajo condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo (Liu *et al.*, 2000). La distribución de la flavohemoglobina entre el citosol y la matriz mitocondrial se regula diferencialmente dependiendo de las condiciones de anoxia y del tipo de genoma mitocondrial, permitiendo de manera indirecta la eliminación del estrés oxidativo (Cassanova *et al.*, 2005). Las proteínas localizadas en uno y otro compartimiento subcelular son codificadas por el mismo gen, ya que la mutación de *yhb1* elimina ambas proteínas y la reintroducción del gen restaura la aparición de la proteína en el citosol y en la matriz mitocondrial (Cassanova *et al.*, 2005). La flavohemoglobina de *S. cerevisiae* (*yhb1*) muestra expresión constitutiva que no se ve incrementada con tratamientos con el donador de NO DETA/NO en cultivos logarítmicos o estacionarios bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Liu *et al.*, 2000). Por el contrario, la respuesta de *S. cerevisiae* al tratamiento con DPTA/NONOate incrementa la expresión de *yhb1* unas 10 veces (Sarver y DeRisi, 2005). Este comportamiento puede ser debido a las diferencias en los donadores de NO, medios de cultivo, cepas de levadura, sensibilidad del método de medida o condiciones de cultivo utilizadas. La expresión de *yhb1* tampoco es significativamente afectada por químicos que imponen estrés oxidativo como el H₂O₂, paraquat y menadiona (Buisson and Labbe-Bois, 1998). Sin embargo, la expresión de *yhb1* es menor en cultivos anaeróbicos de la levadura que en aeróbicos (Liu *et al.*, 2000).

C. albicans posee tres genes que codifican proteínas de tipo flavohemoglobina, pero sólo *Cayhb1* es inducido por NO y es el responsable de la detoxificación del NO producido por los macrófagos. Los mutantes delecionados del gen *Cayhb1* son hipersensibles a NO (DETA) (Ullman *et al.*, 2004). En *A. oryzae* y *A. nidulans* se ha reportado la presencia de dos genes tipo FHG. La flavohemoglobina FHb1 de *A. oryzae*, al igual que la flavohemoglobina fhbA de *A. nidulans*, están presentes en el citosol y muestran altos niveles de expresión en medios suplementados con NO₃, siendo mayor la expresión en medios con un pH ligeramente ácido. Ambos genes (FHb1 y fhbA) codifican las flavohemoglobinas responsables de proteger al hongo del estrés nitrosativo mediante la conversión del NO a NO₃ (Schinko *et al.*, 2010). Las flavohemoglobinas FHb2 y fhbB de *A. oryzae* y de *A. nidulans*, respectivamente, han sido localizadas en la matriz mitocondrial y su función aún resulta una cuestión controvertida. Ambas muestran una secuencia señal mitocondrial y probablemente están implicadas en la detoxificación de NO en la mitocondria (Zhou *et al.*, 2009; Schinko *et al.*, 2013). Schinko *et al.* (2010) y Marcos *et al.* (2016)

reportaron que la expresión del gen *fhbA* de *A. nidulans* es inducido por el gen *NirA* y no por *AreA*. Sin embargo, en el promotor del gen *fhbA* se localizan cuatro secuencias señal de unión para *AreA*. Los autores demuestran que *AreA* regula la expresión de *fhbA* durante la fase de conidiación y no durante la fase de desarrollo (Schinko *et al.*, 2010; Marcos *et al.*, 2016). También se ha demostrado que *fhbA* es inducido en presencia de elevadas concentraciones de NO₂ y pH ligeramente ácido (Schinko *et al.*, 2010). En *A. fumigatus* la flavohemoglobina *fhbA* protege al hongo del estrés nitrosativo producido por el NO, mostrando altos niveles de expresión sobre nitrato y nitrito. Los mutantes delecionados del gen *fhbA* muestran un incremento en la sensibilidad a DETA-NO comparado con la cepa de tipo silvestre, indicando que la flavohemoglobina *fhbA* juega un rol importante en la defensa contra las especies reactivas de nitrógeno (Lapp *et al.*, 2014).

En *B. cinerea* la flavohemoglobina (BCFHG1) es la proteína responsable de la detoxificación de NO, protegiendo al hongo del estrés nitrosativo. Los mutantes con pérdida de función de BCFHG1 son sensibles a NO (Turrión-Gómez and Benito, 2011). *Bcfhg1* se expresa en todas las fases de desarrollo en ausencia de NO exógeno, mostrando un máximo de expresión durante la ventana temporal de germinación (entre las 4 y las 6 h de culvito en medio mínimo líquido), y la exposición a NO exógeno determina un aumento de sus niveles de expresión (Turrión-Gómez *et al.*, 2010).

1.7.3.2 Papel de las flavohemoglobinas en patogenicidad

Las flavohemoglobinas juegan un papel importante en los organismos patógenos, protegiéndoles del estrés nitrosativo creado por el hospedero como mecanismo de defensa (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek, 2014). Así se ha comprobado en la bacteria fitopatógena *Erwinia chrysanthemi*, sistema en el que la flavohemoglobina codificada por el gen *HmpX* es inducida durante la infección y es esencial para el desarrollo de la bacteria (Boccaro *et al.*, 2005), ya que inactiva el NO y previene la inhibición de la respiración celular que éste causa. Pero además, la flavohemoglobina del patógeno puede condicionar la respuesta del huésped. Así, en plantas de *Saintpaulia ionantha* inoculadas con mutantes deficientes en el gen *HmpX* de *E. chrysanthemi* se acumulan altos niveles de NO y se observa activación del programa de muerte celular (Boccaro *et al.*, 2005). Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el gen *hmp* de *E. coli* muestran una reducción en los niveles de NO acumulado *in planta* y una atenuación del choque de NO producido por el patógeno (Zeier *et al.*, 2004). Tomando todos estos datos en su conjunto

podemos deducir que las flavohemoglobinas son unos potentes detoxificadores del NO que reducen la Respuesta Hipersensible (HR) en plantas y el estrés nitrosativo en el patógeno.

La flavohemoglobina (yhb1) de *C. neoformans* es esencial para la virulencia del hongo en ratones al degradar el NO producido por la iNOS, ya que la virulencia de los mutantes deficientes en el gen *YHB1* disminuye en animales de tipo silvestre y se reestablece en animales iNOS^{-/-} (de Jesus-Berrios *et al.*, 2003). Es interesante destacar que en el mismo trabajo se indica que el estudio y caracterización de dobles mutantes de la flavohemoglobina y de la superóxido dismutasa, responsable esta última de la protección de *C. neoformans* al estrés oxidativo, demuestran un efecto sinérgico de ambos sistemas en la reducción de la virulencia sobre ratones.

La reducción de virulencia de los mutantes de flavohemoglobina se ha descrito en *C. albicans* (Hromatka *et al.*, 2005; Ullmann *et al.*, 2004). Como hemos indicado anteriormente, en el genoma de *C. albicans* se han identificado tres genes *FHG*, pero sólo uno, *Cayhb1*, es inducido por NO y responsable de la degradación de NO. La eliminación de este gen determina una reducción de la virulencia (Ullmann *et al.*, 2004). Sin embargo, los mutantes del gen *Cayhb1* de *C. albicans* no recuperan la virulencia en ratones carentes de NOS2, lo que supone que en el modelo de investigación utilizado la producción de NO por parte del huésped no es un determinante fundamental de la virulencia del patógeno y que la reducción de virulencia observada en los mutantes analizados debe ser consecuencia de algún otro proceso de naturaleza aún por determinar (Hromatka *et al.*, 2005).

En la bacteria patógena humana *S. enterica* su flavohemoglobina es necesaria para la infección de ratones, restaurándose la virulencia en ratones carentes de la iNOS (Bang *et al.*, 2006).

1.7.3.3 Papel de las flavohemoglobinas en la regulación del desarrollo

Varios estudios realizados con proteínas tipo flavohemoglobina de microorganismos procariotas y eucariotas demuestran que estas proteínas además de estar implicadas en la protección frente al estrés nitrosativo producido por el hospedador infectado, también están implicadas en funciones de desarrollo y crecimiento. Investigaciones realizadas por Membrillo-Hernández *et al.* (2009) mostraron que el gen *hmp* de *E. coli* regula el

crecimiento de la bacteria en la fase estacionaria, ya que los mutantes deficientes en *hmp* muestran un ligero retraso en el crecimiento (Membrillo-Hernández *et al.*, 1999). En *C. albicans* se ha mostrado que el producto génico de *CaYHB1* regula el desarrollo de la levadura, puesto que los mutantes deficientes en este gen muestran un desarrollo hiperfilamentoso (Hromatka *et al.*, 2005). El producto génico del gen *fHb1* de *A. oryzae* regula el desarrollo de hifas, ya que los mutantes deficientes en *FHb1* presentan alteraciones morfológicas en el micelio (Zhou *et al.*, 2009). En *A. nidulans* la flavohemoglobina *FhbA* regula la conidiación y el desarrollo de hifas. El gen *fhbA* es fuertemente expresado en la fase inicial del desarrollo y su expresión decrece luego gradualmente, mientras que *fhbB* se expresa de forma moderada en la fase inicial del desarrollo y su función parece estar más relacionada con la regulación de la transición de la fase de crecimiento vegetativo a conidiación. Los mutantes deficientes en *fhbA* y *fhbB* muestran un crecimiento superficial y anormal del micelio (Marcos *et al.*, 2016). También se ha reportado que el gen *fhbA* regula la formación de cuerpos de fructificación (Baidya *et al.*, 2011).

En *C. coccodes* utilizando aproximaciones farmacológicas se ha demostrado que el NO juega un papel importante durante la germinación, ya que el exceso de NO retrasa la germinación y el uso de sequestradores de NO acelera la germinación, lo que supone que el NO participa en los procesos fisiológicos de germinación y desarrollo (Wang and Higgins, 2005). En *C. minitans* la adición de NO exógeno inhibe la formación de conidios (Gong *et al.*, 2007). El papel del NO en la formación y desarrollo de estructuras reproductivas y esporas también se ha evidenciado en *N. crassa* (Niennemann and Maier, 1996), *P. blakesleeanus* (Maier *et al.*, 2001) y *Flammulina velutipes* (Song *et al.*, 2000). La ameba *Dictyostelium discoideum* posee dos genes que codifican proteínas tipo flavohemoglobina (*DdFHa* y *DdFHb*) cuya función está relacionada con la protección a estrés nitrosativo, metabolismo de la glucosa, crecimiento y desarrollo celular. Los mutantes deficientes de *DdFHa* y *DdFHb* muestran un marcado incremento en el tamaño de la célula, reducida viabilidad bajo altas concentraciones de glucosa y sensibilidad a estrés nitrosativo. La expresión tanto de *DdFHa* como de *DdFHb* es inducida bajo condiciones sumergidas, incrementándose sus niveles de expresión de 3 a 4 veces en relación con los niveles observados en las células utilizadas como control (Lijima *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

Las proteínas de tipo flavohemoglobina están ampliamente distribuidas en microorganismos procariotas y eucariotas. Las evidencias experimentales acumuladas demuestran que éstas constituyen uno de los principales sistemas enzimáticos de detoxificación de NO en estos grupos de organismos. Mediante esta investigación pretendemos determinar cuáles son las funciones fisiológicas en las que participan las proteínas de tipo flavohemoglobina en el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Son objetivos del presente trabajo los siguientes:

1. Identificación de genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina, genes *FHG*, en las estirpes SP1, muy virulenta, y SP4, poco virulenta, del *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.
2. Determinación de los patrones de expresión de los genes *FHG* durante el crecimiento saprofítico en las estirpes SP1 y SP4 del patógeno en respuesta a NO exógeno y durante su interacción con la planta hospedera.
3. Obtención de mutantes deficientes en los genes *FHG* en ambas estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.
4. Caracterización funcional y fisiológica de los mutantes deficientes en los genes *FHG* de ambas estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* durante el crecimiento saprofítico y durante la interacción con la planta hospedera.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Organismos

2.1.1 Plantas

Para los ensayos de infección se utilizaron plantas de judía (*P. vulgaris* L.) de la variedad “blanca riñón”.

2.1.2 Hongos

En la Tabla 4 se muestran las estirpes de *F. oxysporum* utilizadas en esta investigación, las mismas que fueron colectadas por nuestro laboratorio de plantas de judía (*P. vulgaris*) infectadas en la zona de El Barco de Ávila (Alves-Santos *et al.*, 1999), y conservadas a -80°C.

Tabla 4. Estirpes silvestres y transformantes de *F. oxysporum* utilizadas en esta investigación

Aislado	Origen	Genotipo	Patogenicidad	Año	Raza	VCG
FOP-SP1	La Carrera (CIALE)	Silvestre	Patógeno muy virulento	1993	6	0167
FOP-SP4	La Carrera (CIALE)	Silvestre	Patógeno poco virulento	1994	6	0166
FOP-SP13	Villafranca (CIALE)	Silvestre	Patógeno súper virulento		6	0169
AB82	El Barco de Ávila	Silvestre	No patógeno	1995	--	0167
4287 (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>)	J. Tello (INIA)	Silvestre	Patógeno muy virulento		2	0030
FOP-SP1- Δ FHG1-130	CIALE	Knockout	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP1- Δ FHG1-131	CIALE	Knockout	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP1- Δ FHG2-51	CIALE	Knockout	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP1- Δ FHG2-61	CIALE	Knockout	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP1- Δ FHG3-812	CIALE	Knockout	Patógeno muy virulento	2015	6	0167

FOP-SP1- Δ FHG-818	CIALE	Knockout	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP1- Δ FHG4-619	CIALE	Knockout	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP1- Δ FHG4-637	CIALE	Knockout	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP4- Δ FHG1-239	CIALE	Knockout	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP4- Δ FHG1-244	CIALE	Knockout	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP4- Δ FHG2-314	CIALE	Knockout	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP4- Δ FHG2-315	CIALE	Knockout	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP4- Δ FHG3-705	CIALE	Knockout	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP4- Δ FHG3-728	CIALE	Knockout	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP4- Δ FHG4-508	CIALE	Knockout	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP1- Δ FHG4-516	CIALE	Knockout	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP1- Δ FHG2-51- FHG1RNAi-1	CIALE	Silenciado	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP1- Δ FHG2-51 FHG1RNAi-7	CIALE	Silenciado	Patógeno muy virulento	2015	6	0167
FOP-SP4- Δ FHG2-314- FHG1RNAi-2	CIALE	Silenciado	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP4- Δ FHG2-314- FHG1RNAi-18	CIALE	Silenciado	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP1- Δ FHG1-131-C1	CIALE	Complementado	Patógeno poco virulento	2015	6	0167
FOP-SP1- Δ FHG1-131-C2	CIALE	Complementado	Patógeno poco virulento	2015	6	0167
FOP-SP4- Δ FHG1-244-C1	CIALE	Complementado	Patógeno poco virulento	2015	6	0166
FOP-SP1- Δ FHG1-244-C2	CIALE	Complementado	Patógeno poco virulento	2015	6	0166

2.1.3 Bacterias

E. coli cepa DH5 α (F⁻, supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) fue utilizada en todos los experimentos de transformación bacteriana.

Agrobacterium tumefaciens cepa AGL-1 (C58, RecA, rif, carb, pTiBo542DT-DNA, Succinamopine) (Lazo *et al.*, 1991) fue utilizada para la transformación de *F. oxysporum* con vectores binarios.

2.2 Medios de cultivo

2.2.1 Plantas

Las semillas de judía de la variedad “Blanca Riñón” fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 5% y lavadas varias veces con agua destilada estéril y sembradas en bandejas con vermiculita, un sustrato inerte esterilizado mediante dos ciclos de autoclave de 60 minutos de duración. Éstas fueron mantenidas en las cámaras de germinación de 8 a 10 días a una temperatura de 22 a 25°C, una humedad relativa de 60 a 70% y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad en el invernadero experimental del Instituto Hispano Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), de la Universidad de Salamanca.

Para el cultivo hidropónico las plántulas de judía infectadas con las estirpes silvestres de *F. oxysporum* mantenidas en medio de cultivo de crecimiento de plantas (PGM) (Yedidia *et al.*, 1999).

2.2.2 Hongos

2.2.2.1 Cultivo en medio sólido de *F. oxysporum*

Para el crecimiento de *F. oxysporum* se utilizaron placas de Petri con medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar, Difco), inoculadas con 10 µl de una suspensión de microconidios de cada una de las estirpes de *F. oxysporum* e incubadas por 10 días a 25°C. Pasado este tiempo las placas fueron mantenidas durante 4 - 8 días a 4°C para favorecer la producción de microconidios.

Para la selección de transformantes nulos y silenciados de *F. oxysporum* se utilizó PDA con 75 µg/ml de higromicina B (Roche) o 200 a 600 µg/ml de phleomycina (InvivoGen). Los antibióticos fueron añadidos al medio de cultivo una vez esterilizado en autoclave.

Para ensayos de crecimiento saprofítico de cepas silvestres y transformantes nulos y silenciados se utilizó medio mínimo con 1% glucosa (MMG): 2g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4 g/l KH_2PO_4 ; 0,3 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 10 g/l de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, suplementado con 1,84 g/l (10mM) de tartrato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) (MMG+A) ó 0,89 g/l (10 mM) de nitrato de sodio (NaNO_3) (MMG+N) como fuente única de nitrógeno y 15 g/l de agar bacteriológico.

2.2.2.2 Cultivo en medio líquido de *F. oxysporum*

Para la producción de micelio se utilizó el medio de cultivo PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) con agitación constante a 25°C y 120 rpm, y para la producción abundante de microconidios se incubó a 25°C y 180 rpm. Para evitar la contaminación por bacterias se añadieron al medio 20 µg/ml del antibiótico Cloranfenicol.

Para ensayos de expresión de genes *FHG* se utilizó medio mínimo con 1% glucosa (MMG) y el medio mínimo con 1% glucosa suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) como fuente de nitrógeno y 500 µM de nitroprusiato sódico (SNP) (Sigma) como donador de óxido nítrico (NO) exógeno. Los tratamientos control fueron realizados en las mismas condiciones sin SNP.

Para ensayos de germinación de microconidios de las cepas silvestres y transformantes nulos y silenciados se utilizó medio mínimo con 1% glucosa suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) o 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) y 250 µM de DETA como donador de óxido nítrico (NO). Los tratamientos control fueron realizados en las mismas condiciones sin DETA.

2.2.2.3 Obtención de cultivos monospóricos

Para la obtención de cultivos monoconídicos, se realizaron diluciones seriadas de esporas previamente obtenidas por filtración en embudos con lana de vidrio. 10 µl de la dilución fueron extendidos en placas con medio Agar-Agua, las cuales se incubaron 12 horas a 25°C. Transcurrido este tiempo se observaron las esporas germinadas en lupa binocular (Leica, Germany) y con un bisturí estéril se tomó un microconidio que fue transferido a una placa con medio PDA. Para cultivos monospóricos de transformantes nulos y silenciados se añadió al medio Agar Agua con 50 µg/ml de higromicina B. Los cultivos monoconídicos se incubaron a 25°C.

2.2.3 Bacterias

2.2.3.1 Cultivo de *E. coli* DHα5

E. coli fue cultivada en medio LB (Luria-Bertani) líquido o sólido en experimentos de transformación y producción de ADN plasmídico. El medio LB está compuesto de 10 g/l de Bacto Tryptone (Difco), 5 g/l de Bacto yeast Extract (Difco), 10 g/l de NaCl (Pancreac). Para medio sólido se añadieron 15 g/l de agar bacteriológico. La temperatura de incubación fue de 37°C y para cultivos en medio líquido las células se mantuvieron en agitación constante de 200 a 250 rpm.

2.2.3.2 Cultivo de *A. tumefaciens* cepa AGL-1

A. tumefaciens fue cultivado en medio LB (Luria-Bertani) líquido o sólido a 28°C. Los cultivos en medio líquido se mantuvieron con agitación constante de 200 rpm. Para medio sólido se añadieron 15 g/l de agar bacteriológico. Para la selección de colonias resistentes a ampicilina o kanamicina se añadió al medio de cultivo sólido o líquido una concentración de 100 µg/ml ampicilina (Sigma) o de 50 µg/ml de kanamicina (Sigma) después de haber sido esterilizado el medio de cultivo.

Para los ensayos de cocultivo de *A. tumefaciens* con microconidios de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* estirpes muy virulenta FOP-SP1 y poco virulenta FOP-SP4 se utilizaron los medios de cultivo Medio mínimo (MM), medio de inducción (MI) y medio de cocultivo (MCC) mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Medios de cultivo utilizados en la transformación de *F. oxysporum* mediada por *A. tumefaciens*.

Reactivos	Medio Mínimo (MM) 100 ml	Medio Inducción (MI) 100 ml	Medio Cocultivo (MCC) 1 litro
Buffer K	1 ml	1 ml	10 ml
Buffer M-N	2 ml	2 ml	20 ml
CaCl ₂ 1 %	100 µl	100 µl	1 ml
Glucosa 20 %	1 ml	500 µl	5 ml
FeSO ₄ 0,01 % *	1 ml	1 ml	10 ml
Elementos traza *	500 µl	500 µl	5 ml
NH ₄ NO ₃ 20 %	250 µl	250 µl	2.5 ml

MES 1M	-	4 ml	40 ml
Glicerol 50 %	-	1 ml	10 ml
Acetosiringona 40 *	-	100 µl	1 ml
Kanamicina 50 *	100 µl	100 µl	1 ml
Agar bacteriológico	-	-	15 g
Agua MiliQ estéril	94,15 ml	89,45 ml	894,5 ml

*FeSO₄ 0,01%, Elementos traza, Acetosiringona 40 y Kanamicina 50 se añaden al medio después de esterilizar en autoclave. **Buffer K:** 200 g/l de K₂HPO₄; 145 g/l de KH₂PO₄ pH 7. **Buffer M-N:** 30 g/l de MgSO₄·7H₂O; 15 g/l de NaCl. **Elementos traza:** 0,05 g/l de FeCl₃, 0,728 g/l de KCl, 1,546 g/l de H₃BO₃, 0,846 g/l de MnSO₄ H₂O, 0,375 g/l de ZnSO₄ 7H₂O, 0,125 g/l de CuSO₄ 5H₂O, 0,081 g/l de H₂MoO₄, y 0,001 g/l de CoCl₂ 6H₂O.

2.3 Ensayos de germinación

2.3.1 Obtención de microconidios de *F. oxysporum*

El cultivo de *F. oxysporum* se realizó en placas petri con medio PDA a 25°C durante 10 días. Los microconidios fueron recuperados en condiciones de esterilidad en la cabina de flujo laminar. Los microconidios fueron recogidos añadiendo 10 ml de agua destilada estéril por placa. Con la ayuda de una espátula se separó el micelio del medio de cultivo y la suspensión de microconidios se filtró a través de embudos con la lana de vidrio estéril, lo que permite obtener microconidios limpios y de tamaño uniforme. La suspensión de microconidios se lavó 3 veces con agua destilada estéril mediante centrifugación de 15 minutos a 4.000 rpm. Los microconidios sedimentados fueron transferidos a tubos eppendorf con agua MiliQ estéril y conservados temporalmente a 4°C.

Para la cuantificación de los microconidios se realizaron diluciones 1:100 o 1:50, y se depositaron volúmenes de 10 µl de la dilución en una cámara de recuento celular (hematocitómetro) (Thoma, Germany). El recuento de los microconidios se realizó con el microscopio óptico con el lente de 40X. Los microconidios son viables a 4°C por 48 horas. Transcurrido este tiempo su viabilidad se reduce notablemente. Para su conservación a largo plazo se prepararon suspensiones de microconidios en glicerol al 20 % que fueron almacenadas a -80°C.

2.3.2 Cultivo estático de *F. oxysporum*

Una suspensión de 2×10^8 microconidios/ml en agua destilada estéril fue utilizada como stock inicial de cada una de las estirpes de *F. oxysporum*. La germinación de microconidios fue evaluada en medio mínimo con 1% glucosa suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) o 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) como única fuente de nitrógeno.

Para analizar el efecto del NO sobre la germinación se preparó en cada caso una suspensión de 2×10^6 microconidios/ml en MMG+A o MMG+N a la que se añadieron 12,5 µl de DETA 10 mM (concentración final DETA 250 µM). De cada muestra se tomó una gotita de 100 µl de la suspensión de microconidios correspondiente que fue depositada en el centro de una placa petri de 40 mm x 14 mm (aproximadamente 20.000 esporas). Las placas fueron colocadas en una caja de plástico con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril, para mantener una humedad relativa alta, e incubadas a 25°C. El tratamiento de las muestras control fueron realizadas en las mismas condiciones de cultivo sin DETA.

El número de microconidios germinados y no germinados se evaluó a las 4, 6, 8, 10 y 12 horas. De cada una de las cepas analizadas se tomaron 9 µl de cultivo que fueron depositados en una cámara de recuento celular. Las muestras fueron observadas en el microscopio óptico con el lente 20x y se tomaron 4 a 5 fotografías de diferentes campos. Posteriormente se realizó el conteo de esporas germinadas y esporas sin germinar en cada tiempo.

2.4 Ensayos de crecimiento saprofítico

2.4.1 Ensayos de sensibilidad a estrés nitrosativo

Previamente se realizó un pre-cultivo en placas Petri con medio de cultivo mínimo con 1% glucosa (MMG), suplementado con 10 mM de tartrato de amonio o 10 mM de nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Para ello con la ayuda de un asa bacteriológica se tomó una alícuota de cada uno de los cultivos stock conservados a -80°C y se depositó en el centro de la placa Petri con el medio de cultivo correspondiente y se incubó a 25°C durante 4 a 5 días.

Para evaluar la sensibilidad de los transformantes nulos y silenciados a estrés nitrosativo en medio sólido se utilizó el donador de óxido nítrico SNP (Nitroprusiato de sodio, Sigma). Éste fue esterilizado por filtración y añadido a una concentración de 500 μM al medio de cultivo mínimo con 1 % glucosa (MMG) suplementado con 10 mM de tartrato de amonio o 10 mM de nitrato de sodio como fuente de nitrógeno (después de su esterilización en el autoclave y cuando había alcanzado una temperatura de entre 45 y 50°C).

Con la ayuda de un sacabocados se tomó un cilindro de agar con medio de cultivo y micelio a partir del borde interno de la colonia en crecimiento que fue depositado en el centro de cada placa de Petri con el medio apropiado. Éstas fueron incubadas a 25°C con luz continua. Para cada medio y estirpe a ser evaluados se prepararon tres placas de medio de cultivo con y sin donador exógeno de NO.

La evaluación del crecimiento saprofítico se realizó midiendo dos diámetros perpendiculares de cada colonia a los 2, 3, 4, y 5 días después de la siembra.

2.5 Ensayos de infección *in planta*

Los patogenicidad y virulencia de las cepas de *F. oxysporum* fueron evaluadas según el método original de Pastor-Corrales y Abawi (Pastor-Corrales and Abawi, 1987) y modificado según se describe en Alves-Santos *et al.*, (1999).

Para la producción abundante de microconidios se inoculó *F. oxysporum* en medio de cultivo GOX 6 % pH 7,00: (Sacarosa 60 g/l, Peptona 3 g/l; 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/l KCl; 7 g/l NaNO_3 ; 0,5 g/l KH_2PO_4) e incubado por 2 a 3 días a 25°C y 180 rpm. Los microconidios se filtraron en embudos con lana de vidrio y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, con centrifugaciones de 15 minutos a 4.000 rpm. El sedimento de células fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 ml con agua MiliQ estéril. Se realizaron diluciones de 1:100 o 1:50 y se cuantificó la concentración de microconidios en una cámara de recuento celular con la ayuda de un microscopio óptico con un aumento de 40X. Los microconidios se conservaron a 4°C hasta el momento de la infección.

2.5.1 Ensayos de infección en invernadero

Las raíces de plántulas cultivadas durante 8-10 días tras la siembra (hojas cotiledónicas expandidas al 75 %) se lavaron con agua destilada estéril para eliminar restos de

vermiculita y con unas tijeras estériles se cortaron los ápices radiculares. Las raíces así cortadas se sumergieron en una suspensión de 1×10^6 microconidios/ml de *F. oxysporum* durante 5 minutos. Pasado este tiempo las plántulas fueron transferidas a macetas individuales. Las judías se cultivaron en invernadero durante 5 semanas a partir de la fecha de inoculación, a una temperatura media de 25°C, humedad relativa de 60-70 % y fotoperiodo de la menos 12 h de luz. La evaluación se realizó semanalmente durante cinco semanas consecutivas utilizando la escala CIAT (Pastor-Corrales and Abawi, 1987). La escala CIAT se basa en la evaluación del porcentaje de hojas de la planta que muestran síntomas de la infección (clorosis, amarilleamiento, marchitez, necrosis) y se asigna un índice del 1 al 9 según los distintos porcentajes de hojas afectadas. 1: planta sana; 2: 5 % de las hojas afectadas; 3: 10 %; 4: 15 al 20 %; 5: 25 %; 6: 25 al 40 %; 7: 50 %; 8: 75 % y 9: 100 % planta muerta (Alves-Santos *et al.*, 1999).

2.5.2 Ensayos de infección en medio hidropónico

Los ensayos de infección y mantenimiento de plantas de judía inoculadas en medio hidropónico se realizaron según se describe en Niño-Sánchez *et al.* (2015). Las raíces se lavaron con agua destilada estéril y con tijeras estériles se cortaron los ápices radiculares. Las raíces se sumergieron en una suspensión de 1×10^6 microconidios/ml de *F. oxysporum* durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo las plántulas fueron transferidas a tubos falcon de 50 ml con 30 ml de medio de cultivo PGM cubiertos con papel aluminio. Los tubos falcon fueron sellados con cinta parafilm. Éstos fueron incubados a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y 80 % de humedad relativa durante 21 días. Se tomaron muestras de raíz, hipocotilo y tallo a los siguientes tiempos: raíz, 1, 2 y 3 días; hipocotilo, 5 y 7 días; tallo, 14 y 21 días. Las muestras recogidas fueron inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta su utilización.

2.6 Extracción de ácidos nucleicos

2.6.1 ADN genómico de *F. oxysporum*

Se utilizaron tres métodos de extracción de ADN genómico y tres métodos de extracción de ADN plasmídico.

2.6.1.1 Método “TENSP”

Se utiliza para obtener ADN limpio y poco degradado que será utilizado como molde en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o para digestiones con enzimas de restricción.

Aproximadamente 200 a 300 mg de micelio congelado a -80°C fueron triturados en un mortero con nitrógeno líquido. El micelio pulverizado se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml con 600 µl de solución de lisis TENSP (100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de EDTA, 1 % de PVP; 10 mM de β-Mercaptoetanol) y la muestra fue homogenizada en el vórtex durante 15 segundos e incubada a 65°C con agitación constante durante 30 minutos.

Se añadieron 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1); cada muestra fue homogenizada con una pipeta y centrifugada durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se añadió 1 volumen de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1). Después de agitar brevemente los tubos, las muestras fueron sometidas a una centrifugación durante 5 minutos a 12.000 rpm y 4°C. Este paso se repitió nuevamente con las mismas condiciones. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo con 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (54:1). Después de una breve agitación las muestras fueron centrifugadas de nuevo durante 5 minutos a 12.000 rpm y 4°C y finalmente el sobrenadante en cada caso fue transferido a un nuevo tubo.

Posteriormente se añadieron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 150 µl de acetato de sodio 5,2 M y se incubó durante 2 horas a -80°C o toda la noche.

Las muestras fueron centrifugadas 15 minutos a 14.000 rpm y 4°C, se eliminó el sobrenadante y el DNA precipitado se lavó con etanol 70 %, centrifugando finalmente las muestras 2 minutos a 14.000 rpm. El sedimento resultante en cada caso se secó a temperatura ambiente o en el SpeedVac de 2 a 3 minutos y fue resuspendido en 50 o 100 µl de H₂O MiliQ estéril o en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM).

El DNA fue tratado con 1 µl (1 µl por cada 10 µg de DNA) de RNasa (10 mg/ml) e incubado a 37°C durante 30 minutos. Las muestras fueron conservadas a -20°C.

2.6.1.2 Método CTAB

El método CTAB es adecuado para extraer y purificar ADN de hongos filamentosos y está especialmente indicado para eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos que pueden reducir la pureza del ADN y, por tanto, su calidad.

El micelio de *F. oxysporum* cultivado en medio líquido y conservado a -80°C fue triturado en un mortero con nitrógeno líquido. El micelio pulverizado fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 ml con 300 µl de buffer CTAB (200 ml/l de Tris-base 1 M, 100 ml/l de EDTA pH 8,0; 0,5 M, 20 g/l de CTAB); 300 µl de buffer STE (127,56 g/l de Sorbitol; 24,2 g/l de Tris-base; 3,36 g/l de EDTA) y 150 µl de N-Lauroylsarcosine 5 %. Las muestras fueron homogenizadas con una pipeta e incubadas a 65°C por 1 hora con agitación constante. Posteriormente se añadieron 750 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó la mezcla en el vortex durante 15 segundos, y ésta se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 rpm. Este tratamiento puede repetirse una o dos veces para mejorar la calidad y pureza del ADN. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 600 µl de isopropanol y 150 µl de acetato de amonio 7,5 M. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente 20 minutos y sometida a centrifugación durante 20 minutos a 12.000 rpm. El sedimento resultante fue lavado con 500 µl de etanol 70 % (este lavado se puede repetir 1 o 2 veces), centrifugando durante 10 minutos a 12.000 rpm después de cada lavado. Finalmente, una vez eliminado el etanol, el pellet fue secado a temperatura ambiente o en el speedvac, resuspendido en 50 a 100 µl de agua o TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl), y sometido a un tratamiento con RNasa como se indicó en el caso del procedimiento anterior.

2.6.1.3 Extracción de ADN genómico mediante método rápido

Aproximadamente 200 mg de micelio de cada transformante fue transferido a tubos eppendorf con 30 µl de Tris-HCl 10X, el micelio fue homogeneizado en el medio y agitado fuertemente durante 30 segundos en el vórtex de tal manera que los microconidios se liberen en el medio. Las muestras se calentaron durante 1 a 3 minutos en el microondas y fueron agitadas vigorosamente en el vórtex durante 30 s. A continuación las suspensiones se centrifugaron durante 15 minutos a 12600 rpm a 4°C y en cada caso el sobrenadante con ADN genómico fue transferido a un nuevo tubo y se almacenó a -20°C.

2.6.2 Extracción de ADN Plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico multiplicado en *E. coli* se utilizó el método de lisis alcalina y el kit comercial NucleoSpin®Plasmid. Para la obtención de grandes cantidades de ADN plasmídico de plásmidos con un número reducido de copias por célula se utilizó el Kit comercial NucleoBond®Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel, Germany).

2.6.2.1 Minipreparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

Se inocularon 5 ml de medio de cultivo LB, suplementado con 100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina, con células de *E. coli* portadoras del vector de resistencia a ampicilina o kanamicina de interés. Los cultivos se incubaron durante 12 a 16 horas a 37°C y 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 250 µl de solución I (solución de resuspensión) compuesta por: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8 y 100 µg/ml de RNAsa. La suspensión de células fue homogenizada con una pipeta e incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se añadieron 250 µl de solución II (solución de lisis) compuesta por 0,2 N NaOH y 1 % SDS. La suspensión se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadieron 250 µl de solución III (solución de neutralización) compuesta por 1,3 M de acetato de potasio pH 4,8. El contenido de cada tubo se mezcló por inversión y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con 800 µl de isopropanol. La suspensión se mezcló por inversión y se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 rpm. El isopropanol fue eliminado y se añadieron 800 µl de etanol 70 %. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 rpm, se eliminó el etanol y los sedimentos se dejaron secar al ambiente o en el SpeedVac. El ADN fue finalmente resuspendido en 50 µl de agua MiliQ.

2.6.2.2 Minipreparación de ADN plasmídico con el kit comercial NucleoSpin®Plasmid.

El kit comercial NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel, Germany) se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Células de *E. coli* portadoras del vector de clonación de interés se inocularon en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml y se incubaron durante 12-16 horas a 37°C y 200-250 rpm.

Los cultivos para la obtención de plásmido se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 rpm. Se eliminó el medio de cultivo y el sedimento de células fue resuspendido en 500 µl de buffer A1. La suspensión fue homogeneizada con una pipeta. Seguidamente se añadieron 500 µl de buffer A2 y la suspensión se mezcló mediante inversiones de 6 a 8 veces de los tubos y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 600 µl de buffer A3 y la suspensión se homogenizó manualmente mediante inversiones hasta obtener un lisado totalmente blanco.

La mezcla se centrifugó 5 minutos a 11.000 g y el sobrenadante fue transferido a una columna de purificación. Ésta fue centrifugada durante 1 minuto a 11.000 g, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de buffer AW, previamente calentado a 50°C. La columna se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 g, se descartó el eluido y se lavó la columna añadiendo 600 µl de buffer A4 y centrifugando durante 1 minuto a 11.000 g. Se descartó el eluido y la columna vacía se centrifugó a 11.000 g durante 2 minutos para eliminar los restos del buffer A4.

La columna fue transferida a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se incubó durante 5 minutos a 70°C para eliminar los restos de etanol. Se añadieron entonces 50 µl de buffer AE o agua MiliQ estéril, previamente calentado a 70°C, y la columna se incubó 5 minutos a 70°C para facilitar que el ADN plasmídico se separe de la resina de la columna y sea eluido en el buffer o agua. Finalmente la columna se centrifugó 1 minuto a 11.000 g. La solución con ADN plasmídico purificado se conservó a -20°C.

2.6.2.3 Preparación de grandes cantidades de ADN de plásmidos de reducido número de copia

Se utilizó el Kit comercial NucleoBond®Xtra Midi/Maxi (Macherey-Nagel, Germany) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las células de *E. coli* portadoras de los vectores de clonación PRF-HU2 y PRF-HU fueron inoculadas en 200 ml de medio de cultivo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina e incubadas durante 16 horas a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una

DO₆₀₀ de 0,4, momento en el que se añadieron al cultivo 200 µl de cloranfenicol 170 µg/ml, prolongando entonces la incubación durante 6 horas más a 37°C y 250 rpm para la replicación del plásmido.

Transcurrido este tiempo el cultivo fue transferido a tubos falcon de 50 ml y las células sedimentadas mediante centrifugación durante 5 minutos a 4000 rpm. El pellet de células se resuspendió en 4 ml de buffer RES y las células fueron homogeneizadas en el buffer con la ayuda de una pipeta hasta obtener una suspensión homogénea. Se añadieron 4 ml de buffer de lisis y la mezcla se homogeneizó mediante 8 inversiones sucesivas, incubándola posteriormente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadieron 4 ml de buffer NEU, se mezcló suavemente la suspensión resultante mediante 8 inversiones y ésta fue incubada 5 minutos a temperatura ambiente.

La suspensión se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 rpm para separar el ADN plasmídico de los restos celulares. La suspensión se transfirió a un filtro previamente equilibrado con 12 ml de buffer EQU. Se añadieron 5 ml de buffer EQU, seguido de 8 ml de buffer WASH, se eliminó el residuo y se añadieron 5 ml de buffer ELU. Una vez terminada la filtración se desecha el tubo NucleoBond.

El volumen resultante de buffer ELU con los plásmidos se mezcló con 3,5 ml de isopropanol y la suspensión resultante fue incubada a temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente ésta fue repartida en tubos Eppendorf de 1,5 ml que fueron centrifugados durante 15 minutos a 12.000 rpm. El sedimento fue lavado con 800 µl de etanol 70 % y los tubos centrifugados durante 10 minutos a 12.000 rpm. Se eliminó el etanol y los precipitados de ADN fueron secados a temperatura ambiente o en el speedVac. Finalmente éstos fueron resuspendidos en 20 a 40 µl de agua MiliQ estéril y conservados a -20°C.

2.6.3 Tratamientos enzimáticos del ADN

2.6.3.1 Tratamiento con RNAsa A

Para preparar el stock de RNAsa A se disolvieron 100 mg de RNAsa A liofilizada (Roche, Germany) en 10 ml de agua MiliQ y la solución resultante se calentó a 100°C durante 15 minutos para eliminar las DNasas. La suspensión resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y se conservó a -20°C.

El tratamiento de las muestras de ADN para eliminar RNA se realizó añadiendo volúmenes variables de la solución de RNasa 10 µg/µl (1 µl de RNasa por cada 10 µg de ADN) e incubando la mezcla a 37°C durante 15 a 60 minutos. Para la inactivación de la DNasa se realizó una incubación a a 65°C durante 15 minutos.

2.6.3.2 Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las recomendaciones del proveedor (Promega, Takara y Biolabs). En cada reacción de digestión se añadió 10 % de tampón de digestión, las unidades de enzima de restricción necesarias y la cantidad adecuada de ADN disuelto en agua o buffer TE. La digestión se incubó a 37°C generalmente toda la noche. En el caso de digestiones simultáneas con dos enzimas, el tampón utilizado fue aquél en el que las enzimas presentan la máxima actividad. En el caso de que no existiera tampón compatible para las dos enzimas, las digestiones se realizaron en dos pasos.

2.6.3.3 Ligaciones

Las reacciones de la ligación se realizaron con la enzima T4 ADN ligasa, que cataliza la formación de uniones fosdiéster entre los extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo en ADN o ARN de doble cadena con extremos cohesivos o romos. Las casas comerciales Roche y Takara suministran en cada caso un kit de ligación que incluye la ligasa DNA T4, un tampón 10X con ATP (600 mM de Tris-HCl, 50 mM de MgCl₂, 50 mM de DDT, 10 mM de ATP, pH 7,5). Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10 µl con 1 µl de buffer 10X, 10 a 40 ng de ADN del vector, al menos una cantidad equimolar de ADN a insertar y 1 U/µl de ligasa. La reacción se incubó a 4°C durante 12 a 16 horas para ligaciones con PGM-T Easy y a 16°C para ligación con los vectores PRF-HU2, pEA-FU y pVIR-RNAi.

2.6.3.4 Defosforilación con fosfatasa alcalina (CIEF)

La fosfatasa alcalina es una enzima clasificada dentro de las hidrolasas que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosfórico a pH alcalino, liberando fosfato al medio. Se utilizó para eliminar el grupo fosfato terminal de los extremos 5' del ADN y así evitar la recircularización de plásmidos digeridos con una sola enzima de restricción. De esta forma se favorece la clonación de fragmentos de ADN obtenidos mediante digestión con enzimas de restricción que producen extremos romos. La

reacción de defosforilación se realizó en un volumen final de 10 µl, con 1 µg de ADN digerido, 1 µl de tampón 10X y 2 µl de fosfatasa alcalina CIP (Roche) diluida hasta 0,01U/pmol (0,5 M Tris-HCl pH 9,0; 10 mM MgCl₂; 1 mM ZnCl₂ y 10 mM espermicida) y agua MiliQ. Se incubó a 37°C durante 30 minutos. La desactivación de la enzima se realizó mediante incubación a 65°C durante 15 minutos. Los fragmentos de ADN tratados fueron purificados utilizando el kit comercial NucleoSpin® Gel and PR clean-up (Macherey-Nagel).

2.6.4 Obtención de ARN total de *F. oxysporum*

Para la obtención de ARN total de *F. oxysporum* se utilizaron los siguientes métodos: el método Trizol (Invitrogen) y el método basado en la utilización del kit SV Total RNA Isolation System (Promega).

2.6.4.1 Método Trizol

El Trizol es una solución mono-básica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogeneización de la muestra mantiene la integridad del ARN al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y rompe los componentes celulares. El volumen de la muestra no debe exceder del 10 % del volumen del trizol. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y la otra orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa y puede ser recuperado por precipitación con alcohol isopropílico.

Las muestras de micelio o tejido vegetal congelado a -80°C fueron trituradas en un mortero con nitrógeno líquido. El micelio o tejido vegetal pulverizado fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 ml, al que se añadió 1 ml de Trizol® Reagent (Ambion RNA life technologies), mezclando cuidadosamente con una pipeta para homogeneizar la muestra. Ésta fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la disociación completa de las proteínas. A continuación la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 12.000 rpm y 4°C y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo que fue incubado durante 5 minutos en hielo. Se añadieron 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado y se agitó la muestra manualmente o en un vórtex durante 15 segundos, siendo incubada posteriormente durante 5 minutos en hielo. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C. La muestra se separa ahora en dos fases, una fase roja que

corresponde al trizol-cloroformo y una fase incolora que corresponde a la fase acuosa. El ARN permanece exclusivamente en la fase incolora.

La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se añadió 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El tubo se agitó en el vortex, fue centrifugado durante 10 minutos a 12.000 rpm y 4°C y la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo eppendorf. Dependiendo de la pureza y calidad del ARN que deseamos obtener el tratamiento con 1 volumen cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) se puede repetir 1 o 2 veces. Se añadieron al sobrenadante 250 µl de isopropanol y 250 µl de citrato de sodio (citrato de sodio 0,8 M y NaCl 1,2 M) y se incubó la mezcla durante 10 minutos o toda la noche. Pasado este tiempo se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C. Se eliminó la fase acuosa y se añadió 1 ml de etanol 70 %. La suspensión fue centrifugada durante 5 minutos a 7.500 rpm y 4°C y el sedimento resultante se resuspendió en 25 a 50 µl de agua MiliQ tratada con DEPC 0,1 %. El ARN así preparado se conservó a -80°C hasta su utilización.

2.6.4.2 Obtención de ARN con el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega)

El Kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega) permite obtener ARN de buena calidad y pureza de forma rápida y sencilla. Se realizó la extracción de ARN de micelio o tejido de planta siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El micelio o tejido de planta conservados a -80°C fueron triturados en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo resultante fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 ml con 175 µl de buffer de lisis de ARN (RLA+BME) y la muestra fue homogeneizada con ayuda de una pipeta o por inversión. Se añadieron 350 µl de buffer de dilución de ARN (RDA, blue), mezclando la muestra por inversión de 3 a 4 veces e incubando 3 minutos a 70°C. Se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm. La fase transparente fue transferida a un tubo eppendorf con 200 µl de etanol 95 % (etanol absoluto 99 % + agua DEPC 0,1 %), se mezcló la muestra con una pipeta para homogeneizar la muestra, se transfirió la suspensión a una columna y ésta fue centrifugada durante 1 minuto a 13.000 rpm. Se eliminó el lisado y se añadieron 600 µl de tampón de lavado de ARN (RWA+etanol 95 %). La columna se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 50 µl de DNAsa (40 µl de Yellow core buffer; 5 µl de MnCl₂ 0,09 M; 5 µl de DNAsa I), y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. La inactivación de la DNAsa se realizó añadiendo 200

µl de solución DNAsa stop (DSA + etanol 95 %) y centrifugando durante 1 minuto a 13.000 rpm. El filtro con el ARN fue lavado 2 veces con 600 µl y 250 µl de tampón de lavado (RWA + etanol 95 %) y centrifugado durante 2 minutos a 13.000 rpm. El sedimento de ARN fue recuperado en 50 µl de agua libre de RNAsas.

2.6.4.3 Tratamiento de ARN con DNAsa

El ARN fue tratado con DNAsa utilizando el kit DNA-free™ Kit TURBO™ DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion Life Technologies, USA). Las muestras fueron tratadas con 1 µl de DNAsa a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 5 µl del inactivador de la DNAsa y las muestras se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron centrifugadas durante 1 minuto a 13.000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf. El ARN se conservó a -80°C.

2.6.4.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

Para estimar la pureza del ADN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop N-1000. Los valores de absorbancia de 1,8 a 2,0 a 260 nm y 280 nm, respectivamente, son indicativos de ADN puro. Los valores inferiores indican la presencia de proteínas o de otros contaminantes. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la estimación de la relación Absorbancia 260/ Absorbancia 230. Los valores de 2,0 a 2,2 indican pureza. Una relación inferior supone la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol.

La integridad del ADN también se puede evaluar mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el ADN está integro, se debe observar una banda estrecha de alto peso molecular. Si está fragmentado se observará una banda más o menos ancha y más o menos difusa, en función del grado de degradación, pudiendo aparecer a lo largo de todo el carril de electroforesis. El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular, afectando la reproducibilidad de las técnicas.

2.7 Electroforesis de ácidos nucleicos

2.7.1 Electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa de 0,6 al 2 % preparados en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA). Se utilizaron cubetas horizontales de

15 o 30 cm de largo, con tampón de electroforesis TAE 1X. El ADN se mezcló en proporción 6:1 con el tampón de carga de electroforesis (30 % glicerol; 0,25 % azul de bromofenol y 0,25 % xylene cyanol, Sigma). Se cargaron las muestras en el gel de agarosa incluyendo en cada gel un pocillo para el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder, Fisher). Los geles se sometieron a campos eléctricos de 80 a 100 voltios dependiendo del rango de tamaños a resolver y de la cantidad de ADN. Después de 45 a 60 minutos los geles se tiñeron con bromuro de etidio en una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml en TAE 1X, durante 20 minutos. El ADN se visualizó por medio de luz ultravioleta y se captaron las imágenes por medio del sistema Kodak de grabación digital de imágenes.

2.7.2 Electroforesis de ARN.

Las electroforesis de ARN se realizaron en condiciones desnaturizantes, siguiendo el procedimiento descrito en Sambrook y colaboradores (1989) y las indicaciones mostradas en el manual de marcaje de sondas DIG (Roche Molecular Biochemicals). Los geles de ARN proporcionan la matriz y las condiciones desnaturizantes para una correcta separación y detección del ARN. Se prepararon geles de agarosa al 1 % en tampón MOPS 1X (20 mM MOPS, 5 mM acetato sódico, 1 mM EDTA pH 7) con 2 % de formaldehído y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.

Las muestras de ARN fueron ajustadas a una concentración de 1 µg/µl y se mezclaron en 2 volúmenes de tampón de carga para Northern Blot. Para 500 µl de tampón se añadieron 250 µl de formamida deionizada, 83 µl de formaldehído, 50 µl glicerol 100 %, 10 µl de azul de bromofenol y 57 µl de agua DEPC 0,1 %. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 65°C para desnaturizar el ARN, se incubaron en hielo y se depositaron en el gel. El tampón de electroforesis utilizado fue MOPS 1x. Las muestras migraron a 40 voltios durante 4 horas en una campana de extracción. Debido a la poca conductibilidad eléctrica del tampón MOPS, cada 15 minutos se removió el tampón del polo positivo al negativo. La integridad del ARN se comprobó en el transiluminador de luz ultravioleta.

2.7.3 Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Las muestras de ADN a ser recuperadas fueron preparadas en gel de agarosa del 0,7 % en TAE 1X (la concentración puede variar en función del tamaño del fragmento que se desea purificar). Las condiciones de la electroforesis se realizaron garantizando la máxima resolución y separación del fragmento a ser recuperado. Una vez que el gel había sido

teñido con bromuro de etidio se procedió a recuperar el fragmento deseado cortando la sección del gel de agarosa correspondiente, que fue depositada en un tubo eppendorf de 1,5 ml. El fragmento recuperado fue purificado con el kit comercial NucleoSpin® Gel and PR clean-up siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.8 Vectores de clonación

2.8.1 Vector de clonación pGEM-T Easy

El vector de clonación pGEM-T Easy (Promega) linearizado se utilizó para la clonación de fragmentos amplificados por PCR siguiendo las especificaciones de la casa comercial. pGEM-T Easy se caracteriza por tener una desoxitimidina 3' terminal en ambos extremos, característica que mejora la eficiencia de clonación de productos de PCR debido a que las polimerasas termoestables frecuentemente añaden un residuo de desoxiadenosina de forma no dependiente de molde en los extremos 3' de los fragmentos amplificados. Posee el gen de resistencia a ampicilina como marcador seleccionable (Figura 3). Además tiene una región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*) cuya inactivación insercional permite identificar por color los clones recombinantes. El tamaño del vector es de 3015 pb.

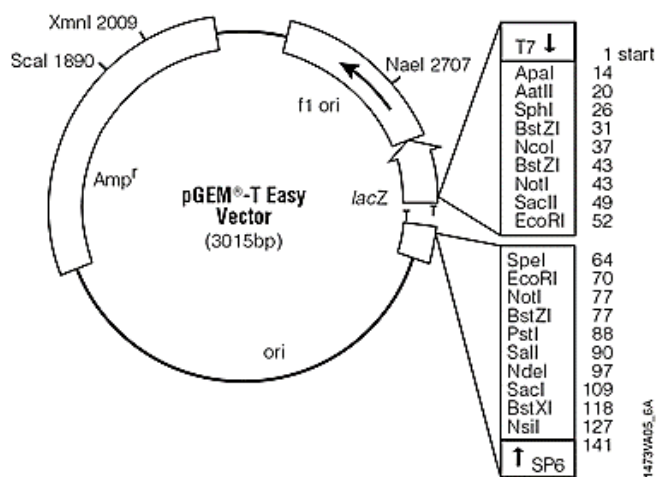


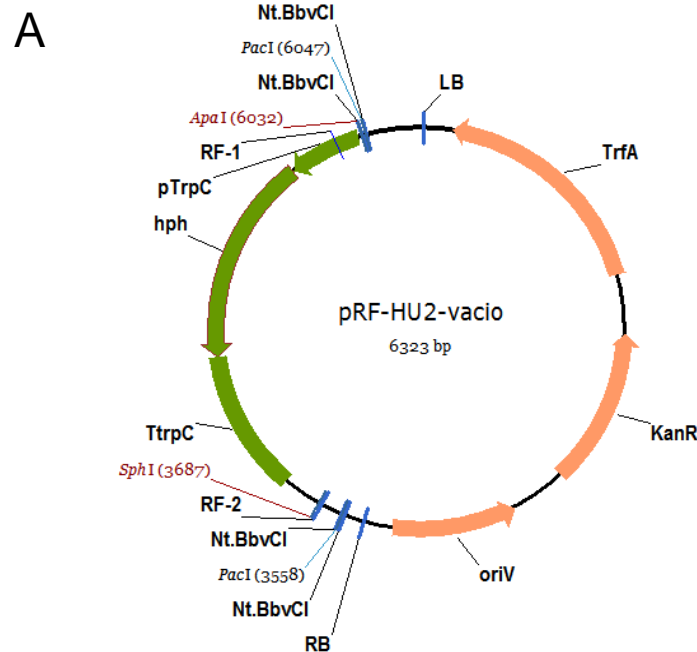
Figura 3. Mapa circular del plásmido pGEM-T easy.

2.8.2 Vector de clonación pRF-HU2

El vector de clonación pRF-HU2 es un vector binario de 6.323 pb utilizado para la clonación de dos fragmentos de ADN en un solo paso (Frandsen *et al.*, 2008) (Figura 4, Panel I).

Posee un gen de resistencia a kanamicina (*KanR*) como marcador seleccionable en *E. coli*; un gen de resistencia a higromicina B (*hph*) como marcador seleccionable en hongos y un gen de iniciación de la replicación del plásmido (*TrfA*). El vector PRF-HU2 posee dos sitios únicos de clonación (UCS's), uno de ellos situado cerca del borde izquierdo (LB) y el otro situado cerca del borde derecho (RB). Cada sitio único de clonación presenta una diana para la enzima de restricción *PacI*, flanqueada por dianas para la enzima de restricción *Nt.BbvCI* (Biolabs, Inglaterra). Los bordes LB y RB constituyen los límites del T-DNA (ADN transferido). El T-DNA es un fragmento de ADN derivado del plásmido Ti de *A. tumefaciens* que es transferido desde la bacteria hacia la célula vegetal huésped.

La digestión de PRF-HU2 con *PacI* y *Nt.BbvCI* divide el plásmido en 2 fragmentos lineales de ADN, cada uno con 2 extremos cohesivos de 9 pares de bases, de las cuales 7 son idénticas en todos los extremos y dos son características de cada extremo. Estas dos bases características de cada extremo proporcionan la direccionalidad de la reacción de clonación, asegurando que los fragmentos de ADN a clonar que previamente han sido generados mediante amplificación por PCR y digestión con la mezcla de enzimas USER se ligen al vector y al fragmento con el gen de resistencia a higromicina en la ordenación correcta, tal y como se indica en la Figura 4.



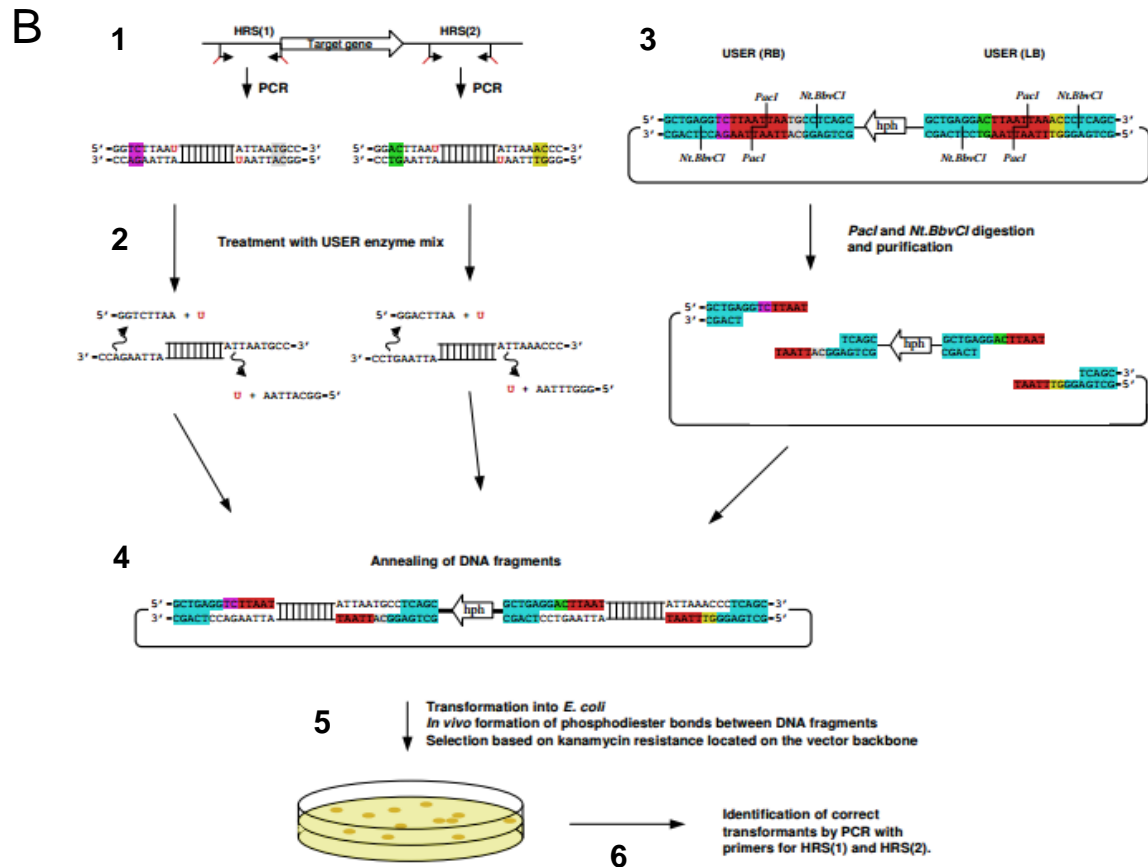


Figura 4. Panel A: Mapa circular del plásmido PRF-HU2. Panel B: Estrategia de clonación utilizando el plásmido PRF-HU2 (tomado de Frandsen *et al.*, 2008). 1: Amplificación de las regiones flanqueantes 5'-3' del gen blanco con cebadores específicos que contienen una extensión de deoxiuridina en orientación 5'. 2: Tratamiento con User Cloning de los insertos amplificados por PCR de las regiones flanqueantes 5'-3' para generar un extremo 3' cohesivo. 3: Digestión plásmido PRF-HU2 con enzimas *PacI* y *Nt.BbvCI* con dos sitios únicos de clonación (LB y RB). Cada UCS's con un sitio restricción *PacI* (color rojo) y dos sitios para *Nt.BbvCI* (color azul) y dos pares de bases únicas que asegura la direccionalidad de la clonación de los insertos (color amarillo, verde, gris y rosa). La digestión del vector resulta en la generación de dos fragmentos con extremos cohesivos 3' de 9 pares de bases. 4: Ligación de los productos amplificados de las regiones flanqueantes 5'-3' al vector PRF-HU2 previamente linearizado con enzimas *PacI* y *Nt.BbvCI*. 5: Transformación de *E. coli*. 6: Verificación de transformantes por PCR de colonia con los cebadores utilizados para amplificar de las regiones flanqueantes 5'y 3'.

2.8.3 Vector de clonación pEA-FU

El plásmido pEA-FU se deriva del plásmido PRF-HU. El casete de resistencia a fleomicina fue amplificado por PCR a partir de ADN plasmídico del vector pVIR-RNAi (Casado del Castillo, sin publicar) con los cebadores PHLEO-RNAi-F, que incluye un sitio de restricción *SphI* en su extremo 5', y 3-Fleomicina-R, que incluye un sitio de restricción *Apal* en su extremo 5', purificado y clonado en el vector pGEM-T. Posteriormente el inserto fue liberado con *Apal* y *SphI*, recuperado de gel y ligado al esqueleto del vector PRF-HU sin el casete

de resistencia a Higromicina B (el casete de resistencia a higromicina fue retirado por digestión con las enzimas de restricción *ApaI* y *SphI*), obteniéndose el vector pEA-FU. El vector pEA-FU posee un sitio único de clonación (UCS) con sitios de restricción únicos para las enzimas *PacI* y *Nt.BbvCI*. Tiene un gen de resistencia a kanamicina (*KanR*) como marcador seleccionable en *E. coli* y un gen de iniciación de la replicación del plásmido (*TrfA*). El casete de resistencia a fleomicina esta formado por el promotor del gen codificador de la enzima glyceraldehydephosphate deshydrogenase (*Pgpd*) de *A. awamori*; el gen (*ble*) como marcador seleccionable en hongos y el terminador transcripcional del gen codificador de la enzima cytochrome oxidase (*Tcyc1*) de *S. cerevisiae*. El vector pEA-FU linearizado posee extremos cohesivos de 9 pb, lo que proporciona la direccionalidad de la clonación en la reacción con sistema USER Friendly Cloning y asegurando el correcto clonaje del fragmento de ADN durante la reacción de clonación. El vector tiene un tamaño de 5.459 pb (Figura 5).

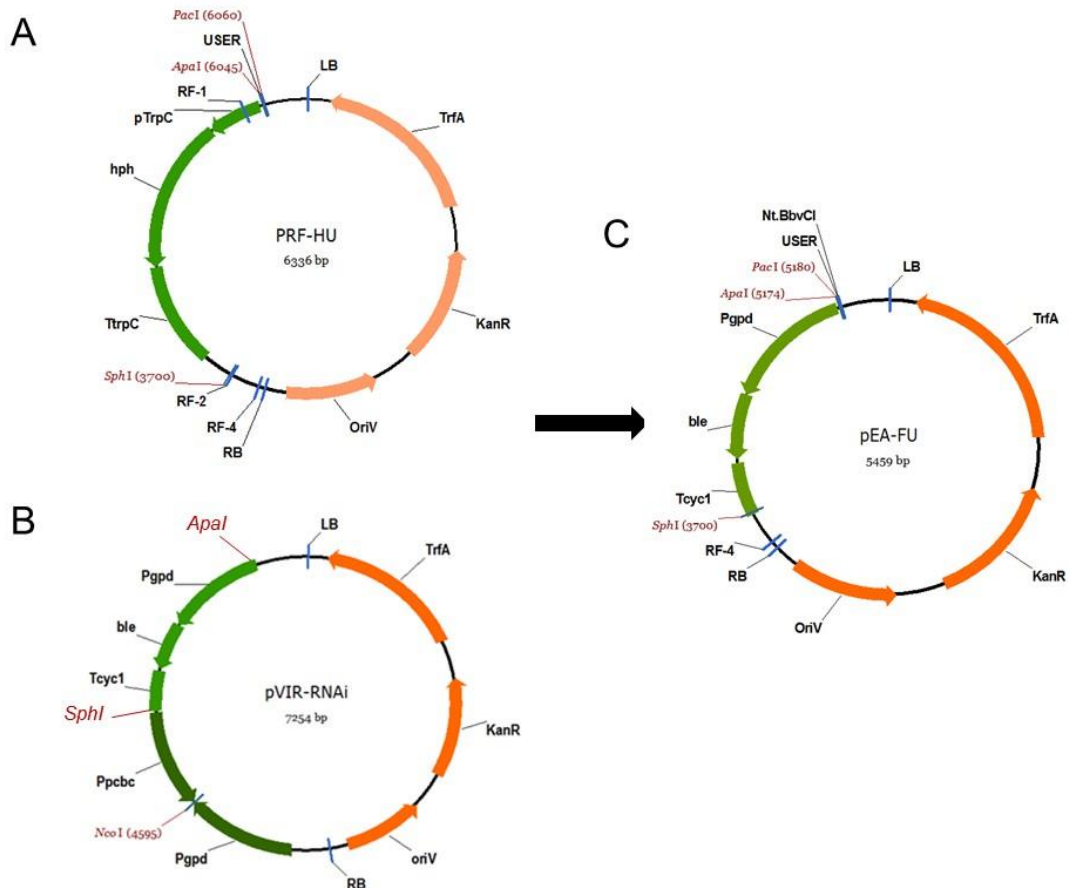


Figura 5. Mapa de construcción del plásmido pEA-FU. Panel A se muestra el plásmido PRF-HU con el casete de resistencia a fleomicina que fue eliminado por digestión enzimática con las enzimas de restricción *ApaI* y *SphI*. Panel B se muestra el plásmido pVIR-RNAi del cual se amplificó el casete de resistencia a felomicina con los cebadores PHLEO-RNAi-F que posee un sitio de restricción *SphI* en el extremo 5' y Fleomicina-R que posee un sitio de restricción *ApaI* en los extremos 5'. Panel C se muestra el plásmido pEA-FU que fue utilizado para ensayos de complementación.

2.8.4 Vector de silenciamiento pVIR-RNAi

El vector de silenciamiento pVIR-RNAi (Casado del Castillo, sin publicar) posee un gen de resistencia a kanamicina (*KanR*) como marcador seleccionable en *E. coli*; un gen de iniciación de la replicación del plásmido (*TrfA*). El casete de resistencia a fleomicina esta formado por el promotor del gen codificador de la enzima glyceraldehydephosphate deshydrogenase (*Pgpd*) de *A. awamori*; el gen (*ble*) como marcador seleccionable en hongos y el terminador transcripcional del gen codificador de la enzima cytochrome oxidase (*Tcyc1*) de *S. cerevisiae*. Este vector presenta un casete de silenciamiento formado por el promotor del gen codificador de la enzima glyceraldehydephosphate deshydrogenase (*Pgpd*) de *A. awamori* y el promotor del gen que codifica la enzima isopenicillin N-synthetase (*PpcbC*) de *P. chrysogenum*, orientados en sentidos opuestos. Entre ambos promotores se ubica un sitio único de clonación *NcoI*, en el cual se inserta el fragmento de ADN del gen diana a ser silenciado. El vector pVIR-RNAi tiene un tamaño de 7.254 pb (Figura 6).

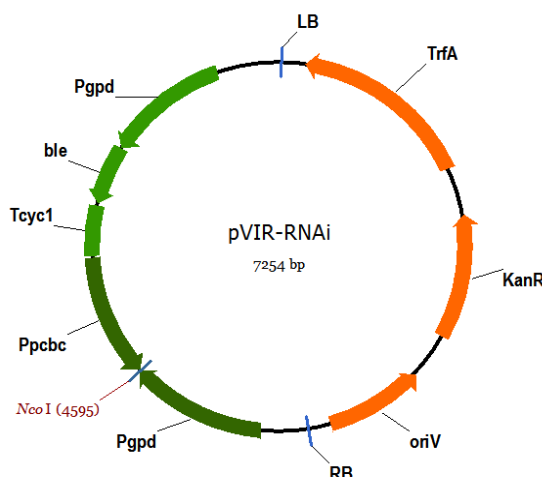


Figura 6. Mapa circular plásmido pVIR-RNAi utilizado para silenciamiento genético.

2.9 Transformaciones

2.9.1 Preparación de células competentes de *E. coli*

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se siguió el siguiente procedimiento. Una alícuota de *E. coli* almacenada a -80°C se sembró en una placa petri con medio LB que fue incubada toda la noche a 37°C. Al siguiente día se inoculó una colonia única en 5 ml de medio de cultivo líquido SOB y el cultivo se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. Se tomó

1 ml de preinóculo que se añadió a 250 ml de medio de cultivo SOB (20 g/l de Triptona, 5 g/l de Extracto de levadura, 0,5 g/l de NaCl, 2,3 ml de glucosa 40 %; 10 ml de KCl 250 mM, ajustado el pH a 7,0 y esterilizado en autoclave. A este medio posteriormente se le añade 5 ml de $MgCl_2$ 2M) extendiendo la incubación 10 a 12 horas a 37°C y 200 rpm (hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,6$). A partir de este momento se trabajó todo el tiempo en hielo (el rotor y la centrífuga deben estar refrigerados). Los 250 ml de cultivo bacteriano fueron transferidos a 4 tubos para la centrífuga (Beckman Avanti®J-25I, USA) y fueron incubados en hielo durante 10 minutos antes de proceder a su centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos y 4°C en un ROTOR JLA-16-250.

Se eliminó el medio de cultivo y las células sedimentadas fueron resuspendidas en 80 ml de buffer TB frío (PIPES 10 mM, $CaCl_2$ 15 mM, KCl 250 mM, ajustar el pH a 6,7 con KOH 1M, y añadir finalmente 55 mM de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$). La suspensión fue homogeneizada agitando manualmente (no se debe usar el vórtex), incubada en hielo durante 10 minutos y centrifugada a 3.000 rpm y 4°C. Se eliminaron los restos de tampón y las células fueron transferidas a 20 ml de buffer TB frío, homogeneizando la suspensión de células de nuevo agitando manualmente. A continuación se añadieron 1,4 ml de DMSO 7%. Las células fueron resuspendidas mediante agitación manual, incubadas en hielo durante 10 minutos y a continuación repartidas en alícuotas de 10 y 100 μ l en tubos eppendorf que fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80°C.

2.9.2 Digestión de los vectores de clonación PRF-HU2, pVIR-RNAi y pEA-FU

Aproximadamente 10 μ g de ADN del vector de clonación PRF-HU2 fueron digeridos con 70 U (7 μ l) de la enzima *PacI* en un volumen total de 200 μ l a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 20 U (2 μ l) de la enzima *PacI* y 40 U (4 μ l) de la enzima *Nt.Bbv.CI* y la suspensión se incubó durante 3 horas. La digestión completa del vector PRF-HU2 fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez comprobada la digestión total del plásmido, el ADN digerido fue purificado sobre columna con el kit comercial NucleoSpin®Gel and PR clean-up, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración final del vector digerido fue aproximadamente de 100 ng/ μ l en un volumen final de 100 μ l. El vector pVIR-RNAi utilizado para la obtención de transformantes silenciados fue linearizado con la enzima *NcoI*. El plásmido pEA-FU, utilizado para la complementación de los mutantes deficientes en el gen *FHG1*, fue digerido con las enzimas *PacI* y *Nt.Bbv.CI* como se ha indicado en el caso del plásmido pRF-HU2.

2.9.3 Ensayos de clonación con el sistema “USER Friendly Cloning”

2.9.3.1 Diseño de oligonucleótidos con un adaptador de uridina

Los oligonucleótidos para la construcción de mutantes deficientes en los genes que codifican las enzimas tipo flavohemoglobina de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* fueron diseñados en base al genoma anotado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* depositado en la base de datos del Broad Institute de la Universidad de Harvard (U.S.A.) (www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group). A partir de las secuencias de las regiones flanqueantes 5' y 3' de cada gen se diseñaron oligonucleótidos específicos a los que se añadió en cada caso un adaptador de 9 pb en el extremo 5' (Primer 1: GGTCTTAAU; primer 2: GGCATTAAU; primer 3: GGACTTAAU; primer 4: GGGTTTAAU). Cada adaptador incluye un nucleótido de Deoxiuridina para permitir la direccionalidad de la clonación con el sistema USER Cloning (Biolabs, Inglaterra). La síntesis de los oligonucleótidos fue realizada por la empresa Integrated DNA Technologies. Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de *F. oxysporum* se presentan en la Tabla 6.

2.9.3.2 Amplificación de las regiones flanqueantes

Los fragmentos correspondientes de las regiones flanqueantes 5' y 3' de cada uno de los genes *FHG* necesarios para la creación de los vectores de remplazamiento génico utilizando el sistema USER Friendly Cloning fueron amplificados por PCR con la enzima pfuTurbo C_x Hoststart ADN polimerasa (Agilent Technologies), que reconoce nucleótidos de deoxiuridina. La amplificación de las regiones flanqueantes 5'-3' se realizaron con el siguiente programa de PCR: un ciclo inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 95°C (desnaturalización) 30 segundos y 35 ciclos de 55°C a 58 °C dependiendo del cebador (Tabla 6) y una la extensión a 72°C durante 1 a 1,5 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa 1 % en TAE 1X, verificando que tuvieran el tamaño adecuado y la concentración suficiente para las reacciones de clonación. Los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial NucleoSpin® Gel and PR clean-up, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9.3.3 Reacción de ligación con USER Friendly Cloning

La reacción de ligación de vector PRF-HU2 linearizado con los insertos 5' y 3' amplificados por PCR de cada uno de los genes se realizó con el kit USER Friendly Cloning (Biolabs, Inglaterra) en un volumen final de 20 µl conteniendo 8 µl del Vector linearizado; 4 µl del Producto de PCR 1; 4 µl del Producto de PCR 2; 1 µl de Enzima USER Friendly Cloning; 1 µl de Buffer 10X y 2 µl de H₂O MiliQ estéril. La reacción de ligación se llevó a cabo en un termociclador incubando a 37°C durante 30 minutos a 37°C y seguidamente a 25°C durante 20 minutos.

2.9.4 Transformación de *E. coli*

Las transformaciones con *E. coli* se realizaron mediante el método de choque térmico. Para ello se mezclaron 100 µl de células competentes de *E. coli* con 20 µl de reacción de ligación (Vector linearizado + productos de PCR) y la suspensión se incubó durante 30 minutos en hielo. Las células fueron incubadas entonces a 42°C durante 2 minutos e inmediatamente en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 450 µl de medio de cultivo LB y la suspensión de transformación se incubó durante 1 hora y 30 minutos a 37°C y 200 rpm. Las células se sembraron en placas petri con medio LB suplementado con el antibiótico adecuado y éstas fueron incubadas durante 16 horas a 37°C.

2.9.5 Transformación de *A. tumefaciens*

2.9.5.1 Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *A. tumefaciens* una alícuota de la cepa AGL-1 se sembró en una placa petri con medio LB y ésta se incubó a 28°C durante toda la noche. A partir de una colonia se realizó un precultivo en 2 ml de medio LB. Se tomaron 20 µl de precultivo y se inocularon en 100 ml de medio de cultivo líquido LB suplementado con 50 µg/ml de rifampicina y 200 µg/ml de carbenicilina. Se incubó toda la noche a 28°C y 200 rpm en la oscuridad hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} = 0,75.

El medio de cultivo con *A. tumefaciens* se distribuyó en dos tubos específicos para la centrifuga Beckman (Beckman Avanti®J-25I, USA), rotor JLA-16.250, en los que fue centrifugado durante 5 minutos a 5.000 rpm y 4°C. Se eliminó el medio de cultivo y las

células fueron lavadas 3 veces con agua MiliQ, con centrifugaciones de 5 minutos a 5.000 rpm y 4°C. A continuación las células fueron resuspendidas en 50 ml de glicerol 10 % frío, homogeneizando la suspensión con agitación manual, repartidas en alícuotas de 40 µl en tubos eppendorf de 1.5 ml y almacenadas a -80°C.

2.9.5.2 Electroporación de *A. tumefaciens*

Para la electroporación se añadieron de 100 a 200 ng de ADN plasmídico (en un volumen igual o inferior a 4 µl) con la construcción de interés en 40 µl de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación fría (mantenida a 4°C). Se aplicó un pulso de 8-12 ms a 1.800 V, 25 µFD, capacitancia 125 µFD y 400 Ω. Las células se recuperaron añadiendo 1 ml de LB e incubando la suspensión resultante durante 2 horas a 28°C y 180 rpm. Posteriormente las células fueron extendidas sobre placas con medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina e incubadas durante 2 días a 28°C.

2.9.5.3 Transformación de *F. oxysporum* mediada por *A. tumefaciens* (ATM)

Se utilizó la metodología de transformación de hongos mediante *A. tumefaciens* propuesta por Mullins *et al.* (2001) y modificada según se ha descrito previamente (Ramos *et al.*, 2007). Una vez seleccionada la colonia de *A. tumefaciens* portadora de la construcción de interés derivada del plásmido PRF-HU2, ésta se cultivó en 2 ml de Medio Mínimo (MM) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina (ver Tabla 5) durante 2 días a 28°C y 180 rpm. Pasado este tiempo se midió la densidad óptica (DO_{600nm}) en un espectrofotómetro y el cultivo se diluyó con Medio de Inducción (MI) suplementado con 200 µM/ml de acetosiringona (inductor de genes de virulencia) hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0,15. La células en MI se incubaron por 6 horas a 28°C y 180 rpm.

Mientras las células de *A. tumefaciens* crecen en MI, los microconidios de *F. oxysporum* fueron recuperados de placas PDA con agua MiliQ estéril, filtradas en un embudo con lana de vidrio estéril y cuantificados en un microscopio óptico con la ayuda de un hemocitómetro. La suspensión de microconidios frescos fue ajustada a una concentración de 1×10^6 microconidios/ml en medio de inducción (MI).

2.9.5.4 Ensayo de cocultivo de *A. tumefaciens* con *F. oxysporum*

Se mezclaron 100 µl de la suspensión de 1×10^6 microconidios/ml con 100 µl del cultivo de *A. tumefaciens* en MI. La mezcla (200 µl) se extendió sobre una membrana de nitrocelulosa (0,45 µm de poro) colocada en placas de Petri con Medio de Cocultivo. Las placas se incubaron por 48 horas a 25°C en la oscuridad cubiertas con papel aluminio para evitar la exposición a la luz y que el hongo crezca muy rápido e inhiba el crecimiento de la bacteria.

Pasado este tiempo las membranas de nitrocelulosa fueron transferidas a placas de Petri con medio PDA suplementado con 100 µg/ml de higromicina B (como agente de selección para transformantes), 200 µM de cefotaxima y 100 µg/ml de moxalactam (para matar las células de *Agrobacterium*) e incubadas a 25°C hasta la aparición de colonias resistentes a higromicina B. Los transformantes individuales resistentes a higromicina B fueron transferidos a nuevas placas de Petri con medio PDA con 100 µg/ml de higromicina B e incubados por 5 días a 25°C.

2.9.5.5 Identificación de transformantes

Los transformantes individuales resistentes a higromicina B fueron evaluados mediante reacciones de PCR a partir de ADN genómico extraído haciendo uso de un método de extracción rápido (descrito en la sección 2.6.1.3 de Materiales y Métodos) utilizando oligonucleótidos diseñados sobre las regiones flanqueantes 5' y 3' del alelo silvestre y de la región codificante del gen de resistencia a higromicina del alelo mutante de tal manera que solamente se obtendrán productos de amplificación en los mutantes en los que han ocurrido eventos de recombinación homóloga simultáneamente en la región flanqueante 5' y en la región flanqueante 3' entre la copia del alelo silvestre del gen de interés y la copia mutante clonada en el plásmido de remplazamiento.

La detección de eventos de recombinación homóloga simultáneamente en las regiones flanqueantes 5' y 3' permite la selección de transformantes en los que ha sido reemplazado el alelo silvestre por el alelo mutante. En cada caso se seleccionaron los transformantes positivos que fueron cultivados en medio líquido PDB con 50 µg/ml de higromicina B. El micelio fue recuperado en papel filtro y macerado en un mortero con nitrógeno líquido. El ADN fue extraído con el método CTAB, tratado con RNasa y cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific).

La ausencia del alelo silvestre y el número de inserciones de T-DNA en el genoma del huésped fueron evaluadas mediante hibridaciones tipo Southern Blot. Los transformantes con inserción de una sola copia de T-DNA fueron purificados mediante 3 a 4 rondas de cultivos monospóricos para eliminar la heterocariosis.

2.10 Construcción de mutantes dobles

2.10.1 Silenciamiento genético

El silenciamiento genético del gen *FHG1* se realizó sobre el fondo genético de los transformantes nulos en el gen $\Delta FHG2$. El inserto de silenciamiento de la región codificante del gen *FHG1* fue amplificado por PCR con los cebadores FO17SilenF y FO17SilenR (ver Tabla 6), a los que se les añadió un sitio de restricción para la enzima *NcoI* en sus extremos 5'. Se amplificó un fragmento de 281 pb que fue purificado y clonado en el plásmido pGEM-Teasy. El inserto liberado mediante digestión con la enzima *NcoI*, recuperado de gel y purificado con el kit comercial NucleoSpin® Gel and PR clean-up fue ligado en el sitio *NcoI* del vector pVIR-RNAi previamente linearizado con la enzima *NcoI*, obteniéndose el vector pEA-RNAi. Con el plásmido pEA-RNAi se transformó *A. tumefaciens* siguiendo el procedimiento mostrado en el apartado 2.9.5.2 de Materiales y Métodos. La transformación mediada por *A. tumefaciens* de las cepas $\Delta FHG2$ de *F. oxysporum* y el análisis de transformantes se realizaron siguiendo los procedimientos mostrados en las secciones 2.9.5.3, 2.9.5.4 y 2.9.5.5 de Materiales y Métodos.

2.11 Complementación de genes

La complementación es una técnica de genética reversa utilizada para devolver la funcionalidad de los genes que han sido reemplazados por disrupción génica. Un fragmento de 3.6 kb de ADN genómico de *F. oxysporum* SP1 que incluye la región codificante del gen *FHG1* flanqueada por un un fagmento de 1300 pb de su región promotora y de un fragmento de 1034 pb de la región terminadora fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleotidos COMP-FOXG-17-F y COMP-FOXG-17-R, en cuyo extremo 5' en cada caso se ha introducido un sitio de restricción *PacI* (ver Tabla 6), fue amplificado con la enzima PCR Extender Polymerase Mix (5 prime). El producto de PCR fue purificado y ligado en el vector pGEM-T. El fragmento liberado por digestión con la enzima *PacI* fue clonado en el plásmido pEA-FU, previamente digerido con *PacI*, dando lugar al plásmido pEA-FU-*FHG1*. Este plásmido fue introducido en las cepas mutantes $\Delta FHG1$ de *F.*

oxysporum SP1 y SP4 mediante transformación mediada por *A. tumefaciens* siguiendo los procedimientos descritos en las secciones previas.

2.12 Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica "in vitro" que permite amplificar mediante procedimientos químicos un fragmento de ADN. Las distintas variantes utilizadas en el presente trabajo se detallan a continuación.

2.12.1 PCR estándar

Las amplificaciones de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizaron utilizando distintas enzimas polimerasas de ADN dependiendo del objetivo de la amplificación. Para amplificaciones en las que se precisaba una gran fidelidad se utilizó la enzima PCR Extender Polymerase Mix (5 prime) y para amplificar secuencias en las que se añadió un nucleótido dUTP a los cebadores se utilizó la enzima pfuTurbo C_x Hoststart ADN polimerasa (Agilent Technologies). Para todas las demás reacciones de PCR se utilizó la ADN polimerasa de Biotools (Biotools).

Las reacciones se realizaron en volúmenes de 25 o 50 µl con 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada uno de los dos cebadores y concentraciones variables de polimerasa. Cada enzima tiene su tampón específico con la concentración de MgCl₂ necesaria para una reacción eficiente.

La cantidad de ADN molde usado varió según el tipo de ADN y su pureza. La cantidad de ADN usada en el caso de ADN genómico fue entre 50 y 100 ng y para ADN de plásmido fue entre 0,01 y 10 ng. En el caso de que la muestra de ADN contuviera impurezas que pudieran inhibir la PCR, el ADN se diluyó con agua MiliQ estéril para tener una mejor reacción. Cuando se quiso comprobar la clonación de un fragmento de ADN en un vector de *E. coli* se añadió directamente 1 µl de cultivo celular a la mezcla de reacción.

Se utilizó un termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems y un termociclador modelo Mastercycler Gradient de Eppendorf. En los ciclos del programa de PCR la desnaturalización se realizó a 94°C durante 30 segundos, la hibridación del cebador durante 30 segundos a una temperatura que osciló entre 55°C y 61°C

dependiendo de la pareja de cebadores y la extensión a 72°C durante periodos variables de tiempo, considerando 1 minuto por cada 1.000 nucleótidos de tamaño del fragmento de ADN que se va a amplificar. Normalmente se aplicaron entre 30 y 35 ciclos, seguidos de una última fase de extensión de entre 5 y 7 minutos de duración. Los distintos oligonucleótidos utilizados en esta investigación fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies y se detallan en la Tabla 6.

2.12.2 RT-PCR

La reacción RT-PCR consiste en la amplificación mediante PCR de fragmentos de cDNA generados por retrotranscripción (RT) de un ARN mensajero original. Se realizó con el kit PrimeScript™ (Takara).

La síntesis de cDNA se llevó a cabo en reacciones con un volumen final de 10 µl que contenían 500 ng de ARN total, 2 µl de tampón 5X, 0,5 µl de Oligo dT 50 µM, 0,25 µl de la enzima PrimeScript RT y agua tratada con DEPC al 0,1% hasta completar el volumen. Las reacciones se realizaron en un termociclador con dos ciclos de temperatura: 15 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C. Los productos de retrotranscripción se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

2.12.3 PCR en Tiempo Real

Se siguieron los procedimientos descritos por de Vega Bartol y colaboradores (de Vega-Bartol *et al.*, 2012). Las reacciones para determinar la recta patrón y las reacciones de PCR cuantitativa propiamente dichas fueron realizadas en el equipo StepOne Plus™ de Applied Biosystems utilizando el KAPA SYBR FAST Prim 2X qPCR Master Mix. Para la amplificación en tiempo real se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes en estudio y para el gen endógeno utilizado como control. Éstos fueron diseñados de acuerdo a las recomendaciones para reacciones de PCR en tiempo real.

Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Para la amplificación se utilizó el kit KAPA que incluye la enzima con el tampón apropiado y solamente hay es necesario añadir los oligonucleótidos correspondientes y completar el volumen establecido con agua MiliQ. Las reacciones se realizaron en volúmenes finales de 10 µl, utilizando como molde cDNA sintetizado a partir de ARN total, según se describe en la sección anterior. Se optimizó el procedimiento preparando en primer lugar una master mix con el tampón y el agua MiliQ

necesarios para el número de reacciones planificadas, calculando 3 reacciones para cada gen y condición a ser analizados. Para un volumen final de 10 µl de reacción se utilizaron 5 µl de tampón 2X, 2,8 µl de agua MiliQ, 0,6 µl 10 µmol de cada uno de los cebadores y 1 µl de cDNA. Se repartieron 10 µl de reacción en cada uno de los tres pocillos de la placa, para así obtener las tres repeticiones propuestas para cada gen y condición.

Las condiciones de amplificación se introdujeron en el termociclador mediante el programa StepOne™ software v2.2.3, con el siguiente perfil: un ciclo inicial a 95°C durante 5 minutos seguido de 40 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C durante 30 s y una fase de extensión a 60°C durante 30 s.

La cuantificación relativa de la expresión de los genes en estudio se realizó mediante el método Ct. Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido. Es importante considerar que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos.

El software Step One mide la amplificación del gen objetivo y del gen endógeno tanto en las muestras experimentales como en la muestra tomada como referencia. Para ello utiliza el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en el cual se comparan directamente los Cts del gen objetivo y del gen de referencia (ΔCt) en cada muestra, y posteriormente se compara los ΔCt de las muestras experimentales con respecto a la muestra control. Este modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100 %) en la eficiencia de reacción en las PCR en tiempo real tanto del gen en estudio como del gen de referencia, lo cual se puede verificar mediante la recta patrón.

2.12.4 Secuenciación

La secuenciación de fragmentos de ADN fue llevada a cabo en un equipo “3100 Genetic Analyzer” de la casa Applied Biosystems del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. Se utilizaron como ADN molde productos de amplificación por PCR previamente purificados (100 ng) o ADN plasmídico (400 a 600 ng), los cuales se prepararon en un volumen final de 8 µl con 3,2 pmol de cebador. La información generada

fue proporcionada en forma de cromatograma y visualizada y editada con el programa informático Geneious.

2.12.5 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo como cebadores para la amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron suministrados por la casa comercial Integrated DNA Technologies. La Tabla 6 presenta el listado de los mismos indicando su nombre, secuencia (5'-3'), Temperatura de anillamiento y una descripción de su utilización.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo de investigación.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Descripción
FHG2qPCR-FW	CCTACTGATGGCAAGCCTCTG	60	PCR cuantitativa expresión gen <i>FHG2</i>
FHG2qPCR-RV	GACCCTGAAGCTTGACACTGA	60	PCR cuantitativa expresión gen <i>FHG2</i>
FHG2-FW	CCTACTGATGGCAAGCCTCTG	59	Marcaje de sonda gen <i>FHG2</i>
FHG2-RV	CTCGAGGAATGCCCTGACATT	59	Marcaje de sonda gen <i>FHG2</i>
FHG4qPCR-FW	GAAGGCAGCCATTTCCCGCA	60	PCR cuantitativa expresión gen <i>FHG4</i>
FHG4qPCR-RV	CGGCGAGTTGGCGGTATGCA	60	PCR cuantitativa expresión gen <i>FHG4</i>
FHG4-FW	GAAGGCAGCCATTTCCCGCA	59	Marcaje de sonda gen <i>FHG4</i>
FHG4-RV	ACCACGGGCGCTGTATTGTT	59	Marcaje de sonda gen <i>FHG4</i>
FHG1qPCR-FW	CTTGATTGGCACCTACCCCG	60	PCR cuantitativa expresión gen <i>FHG1</i>
FHG1qPCR-RV	GATCTTCCGTAACCTTCAGACTG	60	PCR cuantitativa expresión gen <i>FHG1</i>
FHG1-FW	CTTGATTGGCACCTACCCCG	59	Marcaje de sonda ge <i>FHG1</i>
FHG1-RV	TCGGAGGCTGACATACTGACC	59	Marcaje de sonda gen <i>FHG1</i>
FHG3qPCR-FW	TCGGAGGCGATGCCCTCAACC	60	PCR cuantitativa expresión gen <i>FHG4</i>
FHG3qPCR-RV	CATGGGAGTGACACCGACACC	60	PCR cuantitativa expresión gen <i>FHG4</i>
FHG3-FW	CTCCTCGACCTGACTACTACC	59	Marcaje de sonda gen <i>FHG4</i>
FHG3-RV	GTTGCCCTTGACGCAGAGC	59	Marcaje de sonda gen <i>FHG4</i>
FHG135	**GGTCTTAAUATGAGCGATCTC GGTTGGTC	58	Amplificación región flanqueante 5' gen <i>FHG2</i>

RHG135	<u>**GGCATTAAUTGACAGCTGGAT</u> CTTGGTGG	58	Amplificación región flanqueante 5' gen <i>FHG2</i>
FHG133	<u>**GGACTTAAUTGCTGTCGTCTTT</u> TTGCAGC	58	Amplificación región flanqueante 3' gen <i>FHG2</i>
RHG133	<u>**GGGTTTAAUCAATCTCAACAAG</u> CGGTGGC	58	Amplificación región flanqueante 3' gen <i>FHG2</i>
FHG155	<u>**GGTCTTAAUTGACTTGATGCAT</u> CCAGGGC	57	Amplificación región flanqueante 5' gen <i>FHG4</i>
RHG155	<u>**GGCATTAAUUGCCGAGACATA</u> CGTTCTTCG	57	Amplificación región flanqueante 5' gen <i>FHG4</i>
FHG153	<u>**GGACTTAAUACTCCTGAGTTCA</u> CGACTGG	57	Amplificación región flanqueante 3' gen <i>FHG4</i>
RHG153	<u>**GGGTTTAAUUGGCATTCTGTTAA</u> ACTACCGC	57	Amplificación región flanqueante 3' gen <i>FHG4</i>
FHG175	<u>**GGTCTTAAUGATAAGCAATGCT</u> GAATAATGG	56	Amplificación región flanqueante 5' gen <i>FHG1</i>
RHG175	<u>**GGCATTAAUCTCCGATCACCC</u> TCAGTGC	56	Amplificación región flanqueante 5' gen <i>FHG1</i>
FHG173	<u>**GGACTTAAUTGAGATGACATAT</u> CCTCGTG	58	Amplificación región flanqueante 3' gen <i>FHG1</i>
RHG173	<u>**GGGTTTAAUATGTTCTGTGCA</u> AATGGGAC	58	Amplificación región flanqueante 3' gen <i>FHG1</i>
FHG185	<u>**GGTCTTAAUCCTTGAGAGTCTA</u> AGACGGGC	58	Amplificación región flanqueante 5' gen <i>FHG3</i>
RHG185	<u>**GGCATTAAUATGACACAGCAA</u> GGGCATGGC	58	Amplificación región flanqueante 5' gen <i>FHG3</i>
FHG183	<u>**GGACTTAAUGTTTCGACGACA</u> CATTGGGC	58	Amplificación región flanqueante 3' gen <i>FHG3</i>
RHG183	<u>**GGGTTTAAUAGGTGTATACGC</u> AACAGCCTC	58	Amplificación región flanqueante 3' gen <i>FHG3</i>
HphAC	CGGGCAGTTCGGTTTCAGGC	61	Amplificación PCR gen higromicina
HphBC	CGTCTGGACCGATGGCTGTG	61	Amplificación PCR gen higromicina
FHG2-KN-FW	TGACCTGGTACAACGCACCG	58	Selección de transformantes <i>FHG2</i>
RHG2-KN-RV	CCGTGTGCGGTGAGACAAGACT	58	Selección de transformantes <i>FHG2</i>
FHG1-KN-FW	TGCAGTCTGCTGGGTTGGCG	56	Selección de transformantes <i>FHG1</i>
RHG1-KN-RV	CAGCATTTGACCTCGTTCGG	56	Selección de transformantes <i>FHG1</i>
FHG4-KN-FW	GTTCCTAGAACTAAGTCTTTGCC	58	Selección de transformantes <i>FHG4</i>
RHG4-KN-RV	GTTCGAGAACAGAACTTGGGC	58	Selección de transformantes <i>FHG4</i>
FHG3-KN-FW	TAGTGCCGACAGGACGCTAC	58	Selección de transformantes <i>FHG3</i>
RHG3-KN-RV	AGACATGTCACGACGAAGTGAC	58	Selección de transformantes <i>FHG3</i>
RF-2-RV	TCCTTGCATGCACCATTCTTG	58	Verificación orientación insertos construcción
RF-1-FW	CACCGCCTGGACGACTAAAC	58	Verificación orientación insertos construcción
RF-1HU-R	CGGGCCTCTTCGCTATTACG	58	Verificación orientación insertos construcción
RF-2HU-F	GTTTCTGGCGCGTTTGCAGG	58	Verificación orientación insertos construcción

EF1αQ1-F	CATCGGCCACGTCGACTCT	60	Amplificación PCR gen factor elongación EFα1
EF1αQ2-R	AGAACCCAGGCGTACTTGAA	60	Amplificación PCR gen factor elongación EFα1
EF2B-RV	GGAAGTACCAGTGATCATGTT	58	Amplificación PCR gen factor elongación EFα1
PHLEO-RNAi-FW	*AGCTGCATGCTTAAAGCCTTCG AGCGTCCCAA	58	Amplificación PCR ORF gen Phleomycin
3-Fleomicina-RV	*GGGGCCCCAGTGAATTCGAGC TCGCT	58	Amplificación PCR ORF gen Phleomycin
FO17Silen-FW	*TACTCCATGGACGCCACCTATA TCGACAAGC	59	Amplificación PCR inserto Silenciamiento <i>FHG1</i>
FO17Silen-RV	*CTTGCCATGGCTCCAGCCATCC CATTGCG	59	Amplificación PCR inserto Silenciamiento <i>FHG1</i>
RNAi-U4-RV	GGTCTTAATGCCTCTTCGCTATT ACGCCAGCT	58	Verificación construcción silenciamiento <i>E. coli</i>
RNAi-FWD	*GTGCATGCCTCCAGGTTGTCTC AGCATAAACACC	58	Verificación construcción silenciamiento <i>E. coli</i>
Fleo-FW	CGCCGATCTCGGTCATGG	59	Amplificación PCR ORF gen Phleomycin
Fleo-RV	CCAAGTTGACCAGTGCCGTTCC	59	Amplificación PCR ORF gen Phleomycin
COMP-FOXG-17-F	*TTCAAGTTAATTAATGCAGTCTG CTGGGTTGGCG	57	Amplificación gen completo <i>FHG1</i>
COMP-FOXG-17-R	*GCCAGCTTAATTAACAGCATTT GACCTCGTTCGG	57	Amplificación gen completo <i>FHG1</i>

** Extensión de Uridina, * Sitio de restricción, FW o F = cebador forward; RV o R= cebador reverse

2.13 Hibridación de ácidos nucleicos

2.13.1 Marcaje de sondas

Las sondas se marcaron con un método no radioactivo basado en la incorporación de un dUTP unido a la digoxigenina (DIG, Roche) en los fragmentos de ADN. La digoxigenina es un esteroide encontrado en la naturaleza en las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*. Se enlaza en la posición C5 de la uridina mediante un brazo que contiene 11 átomos de carbono. Los nucleótidos marcados con DIG pueden ser incorporados a las sondas de ácidos nucleicos por DNA polimerasas y por RNA polimerasas.

Antes de la elaboración de las sondas se optimizaron las condiciones de la reacción de marcaje mediante PCR. Una vez comprobado que se obtenía un único producto de amplificación y en cantidad suficiente en una reacción de PCR estándar, se procedió a sustituir en la reacción de PCR la mezcla de dNTPS por la mezcla de nucleótidos del kit de marcaje “Polymerase Chain Reaction Digoxigenin Labeling Mix (Roche)”. Como control positivo de amplificación por PCR se realizó una reacción con dNTPS normales. Se comprobó en gel de agarosa 1% en TAE 1x el correcto marcaje de la sonda, ya que el

tamaño de la banda marcada con DIG es siempre de mayor peso molecular que la banda amplificada con dNTPs normales. Las sondas fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

2.13.2 Hibridación Southern blot

La técnica fue desarrollada por Southern (Southern, 1975). Para su realización se ha seguido el protocolo descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) y las recomendaciones de la casa comercial Roche recogidas en el manual de usuario "Dig User's manual" (dNTPs marcados con digoxigenina).

Las muestras de ADN digerido con enzimas de restricción se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,9 % en TAE 1X. Los geles fueron teñidos en bromuro de etidio y visualizados en el transluminador de luz UV. Posteriormente el gel fue expuesto a luz UV de 260 nm de longitud de onda durante 5 a 7 minutos con el fin de crear roturas en las moléculas de ADN y favorecer así la transferencia de fragmentos de ADN relativamente grandes.

Los geles se sumergieron en solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) durante 1 h en agitación a temperatura ambiente y posteriormente en solución de neutralización (Tris-HCl 1 M pH 7,5 NaCl 1,5 M) en las mismas condiciones. Después de estos tratamientos se procedió a transferir el ADN a una membrana de nylon. La unidad de transferencia consistió en una bandeja que contenía el tampón de transferencia SSC 10X (NaCl 1,5 M; citrato sódico 0,15 M pH 7,0) sobre la que se sujetó una placa de plástico. Sobre ésta se colocó una pieza de papel Whatman 3MM cuyos extremos se sumergían en el tampón de transferencia. El gel se colocó sobre el papel Whatman 3MM y sobre él se dispuso una pieza de membrana de nylon Hybond-N (Amersham International) y 3 piezas de papel Whatman previamente humedecidas en tampón SSC 10X, todas de las mismas dimensiones que el gel. Se eliminaron las burbujas de aire entre las distintas capas. El gel se rodeó con láminas de plástico y sobre el conjunto gel-membrana se colocó una resma de papel absorbente y un peso de aproximadamente 500 g. Transcurridas 16 h se procedió a la fijación irreversible del ADN a la membrana mediante exposición a luz UV en un Stratalinker. Estas membranas se guardaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

A continuación, los pasos seguidos en todos los casos fueron prehibridación, hibridación, lavado de filtros, detección y eliminación de sonda. La prehibridación y posterior hibridación

de las membranas a las cuales habían sido transferidos los ácidos nucleicos se realizaron en tubos de vidrio perfectamente cerrados, con agitación moderada y constante, utilizando 50 ml de buffer de prehibridación para mantener las membranas siempre húmedas. La temperatura de prehibridación y de hibridación de ADN fue 65°C para sondas homólogas y 60°C para sondas heterólogas.

El tampón de prehibridación e hibridación consta para un volumen total de 50 ml, de 32 ml de H₂O MiliQ, 12,5 ml de tampón SSC 20X, 5 ml de Blocking reagent (Roche) 10 %, 500 µl de N-laurilsarcosina 10 % y 100 µl de SDS 10 %. La prehibridación se realizó a 65°C durante 1 hora y treinta minutos con agitación constante. Seguidamente la solución de prehibridación fue retirada y reemplazada por la solución de hibridación con la sonda diluida, previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 100°C. La hibridación se extendió durante 16 horas en el horno de hibridación con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de hibridación y ésta se conservó a -20°C para su posible reutilización.

El lavado de la membrana para eliminar los restos de sonda consistió en 2 incubaciones de 5 minutos a temperatura ambiente con solución de lavado 2X SSC (2X SSC, SDS 0,1% (p/v), seguida de 2 lavados de 15 minutos a 65°C con solución 0.1X SSC (0,1X SSC, SDS 0,1 % (p/v).

La detección se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación. Las soluciones empleadas en la detección se diluyeron en tampón 1 (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM pH 7,5). Las membranas se equilibraron en tampón de lavado (tampón 1 con Tween 20 0,3 % (v/v)) durante 5 minutos y se incubaron en tampón 2 durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear la membrana. Pasado este tiempo las membranas se incubaron en tampón 2 (Tampón 1 + Blocking Reagent 10 %) con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Anti Digoxigenin AP, Roche) (dilución 1:20.000) durante 30 minutos. A continuación, las membranas se lavaron dos veces con tampón de lavado durante 15 minutos para eliminar el anticuerpo que no se hubiera unido a la sonda.

Las membranas se equilibraron en tampón 3 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 10 mM pH 9,5) durante 5 minutos. La membrana se colocó sobre una lámina de plástico y se añadió el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche). Este sustrato es muy sensible a la acción

de la enzima fosfatasa alcalina, cuya acción modifica el sustrato produciéndose emisión de luz visible. Las membranas se incubaron en la oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente se retiró el exceso de líquido de las membranas y éstas fueron transferidas a una nueva lámina de plástico. Las posibles señales emitidas fueron visualizadas en el equipo de bioluminiscencia Intelligent Dark Box II (Fujifilm).

Para eliminar la sonda de las membranas, éstas fueron lavadas 2 veces con tampón SSC 0,1X calentado a 100°C durante 20 minutos en agitación. Las membranas fueron entonces reutilizadas o guardadas a 4°C.

2.13.3 Hibridación Northern blot

Las muestras de ARN fueron separadas mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes tal y como se indica en la sección 2.7.2 de Materiales y Métodos. En este caso todas las soluciones utilizadas fueron tratadas con agua DEPC al 0,1% para eliminar las RNAsas. Previo a su utilización para preparar las soluciones correspondientes, el stock de agua DEPC 0,1 % fue incubado durante una hora a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente y esterilizado en autoclave.

Una vez finalizada la electroforesis del ARN el gel se incubó dos veces en solución SSC 20X durante 15 minutos. La metodología para la transferencia fue esencialmente la misma que la descrita para la transferencia de ADN, incluyendo únicamente 2 lavados adicionales del gel, una vez concluida la electroforesis, en solución SSC 20X durante 15 minutos y la utilización de solución SSC 20X como tampón de transferencia.

La prehibridación y la hibridación se realizaron con el tampón de hibridación Standard buffer + 50 % formamida deionizada, SSC 5X, SDS 0,02 %, Blocking Reagent 2 % y N-laurilsarcosina 0,1 %. La prehibridación se realizó a 50°C durante una hora y treinta minutos. La sonda se desnaturalizó a 95°C durante 10 minutos y se añadió a la solución de prehibridación. La hibridación se realizó en tubos de hibridación incubados en el horno de hibridación durante 16 horas. Una vez finalizada se recuperó la solución de hibridación y se conservó a -20°C para futuros usos.

Los procedimientos de lavado y detección fueron esencialmente los mismos que se realizaron para llevar a cabo las hibridaciones Southern Blot, al igual que los procedimientos para la eliminación de la sonda del filtro.

2.14 Microscopía

2.14.1 Microscopía óptica

La estimación de la concentración de microconidios de las estirpes de *F. oxysporum*, así como los mutantes generados, se realizó en hemocitómetros con la ayuda de un microscopio óptico marca LEICA.

La observación y separación de bloques de agar con microconidios germinados en agar-agua para la obtención de cultivos monoconídicos se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio marca LEICA.

2.15 Análisis de datos

2.15.1 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en reacciones de PCR se diseñaron con ayuda de los programas informáticos Geneious (Biomatters), Vector NTI Suite 9 (Invitrogen) y Primer-BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.15.2 Diseño de plásmidos

Para el diseño y representación gráfica de plásmidos y construcciones se utilizaron los programas VectorNTI Suite 9 (Invitrogen) y Geneious (Biomatters).

2.15.3 Alineamiento de secuencias

Los alineamientos de secuencias se realizaron mediante el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Thompson *et al.*, 1994).

2.15.4 Búsqueda y comparación de secuencias

Las comparaciones de secuencias usando las diferentes variantes del algoritmo BLAST (BLASTN, BLASTX, BLASTP) se realizaron en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

La identificación de secuencias señal de localización mitocondrial se realizó con el programa TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) y con el programa MITOFATES (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi>).

2.15.5 Diseño de árboles filogenéticos

Para la construcción de árboles filogenéticos se utilizó el programa Fasttree <http://www.microbesonline.org/fasttree/> (Price *et al.*, 2009).

2.15.6 Búsqueda de secuencias de *F. oxysporum*

El acceso al genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se realizó a través de la página web del Broad Institute de la Universidad de Harvard, sección “Fungal Genome Initiative” usando el link (<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/fungal-genomics>). En la actualidad la página del Broad Institute no está en funcionamiento, aunque los genomas secuenciados y anotados de distintos aislados de *F. oxysporum* continúan siendo accesibles en el JGI (Joint Genome Institute), <http://genome.jgi.doe.gov/Fusox2/Fusox2.home.html>, y en la página web Fungi DB (Fungal and Oomycete Genomics Resources), <http://www.fungidb.org/fungidb/> (Stajich *et al.*, 2012).

2.15.7 Cuantificación de ADN y ARN

Para la cuantificación de ADN, cDNA y ARN se utilizó el software del espectrofotómetro NanoDrop N-1000.

2.15.8 Edición de texto y tablas

Para la edición de texto en este trabajo se ha utilizado el editor de texto Word 13. Para el manejo de tablas de datos y la elaboración de los distintos tipos de representaciones gráficas presentadas en el mismo se ha hecho uso de Excel 13.

2.15.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico ANOVA y la discriminación de medias mediante el test de Tukey en el estudio de crecimiento saprofítico y germinación de microconidios de mutantes delecionados y silenciados se realizó con el software Bioestadístico INFOSTAT 2014 desarrollado bajo la plataforma Windows. El analisis estadístico pareado entre las distintas cepas silvestres y mutantes se realizó aplicando la prueba T-Test de Student (<http://www.studentsttest.com>).

3 RESULTADOS

Debido al reconocido papel del NO en distintos patosistemas y la escasa información científica existente sobre la función que cumplen los mecanismos de detoxificación del NO en hongos filamentosos, nuestro grupo de investigación inició este trabajo con el fin de caracterizar estructural y funcionalmente los genes codificadores de la enzimas de tipo flavohemoglobina en el hongo patógeno de judía (*Phaseolus vulgaris*) *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

3.1 Identificación de los genes codificadores de enzimas tipo flavohemoglobina de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

3.1.1 Análisis de las bases de datos de secuencias de genomas de *Fusarium*.

A lo largo de la última década ha sido posible secuenciar el genoma de aislados representativos de varias especies del género *Fusarium*. El complejo de especies *F. oxysporum* ha atraído especial atención dada su importancia como agente fitopatógeno y en la actualidad se dispone de información sobre el genoma de 10 aislados representativos de formas especiales que infectan plantas, de un aislado con capacidad de biocontrol (Fo 47) y de un aislado patógeno de humanos (Fo human). La base de datos del Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/) también recoge información sobre la secuencia del genoma de la cepa 7600 de *F. verticilloides* y de la cepa PH-1 (NRRL 31084) de *F. graminearum*. Todas estas cepas fueron seleccionadas inicialmente como cepas de trabajo en un proyecto centrado en el análisis comparativo del genoma de aislados del género *Fusarium*.

En la parte inicial de nuestro trabajo, y con el objeto de identificar genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina en el genoma de nuestros aislados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, decidimos analizar el genoma de la cepa 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* estudiando las anotaciones automáticas efectuadas y depositadas en la base de datos del Broad Institute y buscando genes anotados como codificadores de enzimas con actividad “NO dioxigenasa” o con actividad “flavohemoglobina”. Cabe mencionar que las versiones de este genoma depositadas en la base de datos del Broad Institute han sido actualizadas en varias ocasiones en los últimos años. Así, en la versión del año 2012

nuestro análisis permitió identificar la presencia de cuatro genes “de tipo flavohemoglobina”. En la versión 2015 se identifican únicamente 3 genes. Detectadas estas inconsistencias, que atribuimos a variaciones debidas a los distintos programas utilizados para la anotación automática de los genomas y su actualización, nuestro grupo de investigación decidió continuar trabajando con los cuatro genes identificados en la versión del año 2012, todos ellos caracterizados por codificar proteínas que presentan los dominios funcionales característicos específicos de proteínas de tipo flavohemoglobina.

Los códigos de los cuatro genes identificados en el genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* son: FOXG_17028.3, FOXG_13752.3, FOXG_18012.3 y FOXG_15840.2 (Tabla 7). Con los mismos criterios de búsqueda se analizó el genoma de las cepas secuenciadas de *F. verticilloides* (7600) y *F. graminearum* (PH-1). En estos casos se identificaron 3 y 2 “genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina”, respectivamente. Los códigos identificativos de todos ellos se incluyen en la Tabla 7. En la misma, los genes identificados en las distintas cepas se presentan ordenados en función de la similitud que presentan entre ellos (es decir, en la misma fila de la tabla se presentan los genes de las distintas cepas que pueden ser considerados como ortólogos).

Tabla 7. Códigos de genes codificadores de proteínas tipo flavohemoglobina del género *Fusarium*. Columna 1: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, columna 2: *F. verticillinoide*s; columna 3: *F. graminearum*.

<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>F. verticillioide</i> s 7600	<i>F. graminearum</i> PH-1
FOXG_17028.3 (1)*	FVEG_13827.5 (1)*	
FOXG_13752.3 (2)*	FVEG_11186.5 (2)*	FGSG_04458.3 (2)*
FOXG_18012.3 (3)*	FVEG_14660.5 (3)*	FGSG_00765.3 (1)*
FOXG_15840.2 (4)*		

* La numeración entre paréntesis corresponde a la utilizada en el árbol filogenético Figura 18

3.1.2 Detección mediante PCR de genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Decidimos determinar si existen en el genoma de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* genes ortólogos de los cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina detectados en el genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Consideramos interesante

estudiar esta situación en cuatro cepas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* con características fisiológicas muy distintas: la cepa FOP-SP1 (muy virulenta), FOP-SP4 (poco virulenta), FOP-SP13 (supervirulenta) y AB82 (no patógena). Con este objetivo analizamos en detalle la secuencia de nucleótidos de cada uno de los cuatro genes de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y diseñamos para cada gen dos cebadores que permitían amplificar mediante PCR específicamente un fragmento de ADN de cada gen. La Tabla 8 muestra los nombres de los oligonucleótidos diseñados y en la Tabla 6 de la sección de Materiales y Métodos se presentan las secuencias de los mismos.

Tabla 8. Códigos de los oligonucleótidos diseñados sobre los genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y utilizados en reacciones de PCR para detectar los genes ortólogos en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Genes de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Nombre del oligonucleótido
FOXG_17028.3	FHG1-FW FHG1-RV
FOXG_13752.3	FHG2-FW FHG2-RV
FOXG_18012.3	FHG3-FW FHG3-RV
FOXG_15840.2	FHG4-FW FHG4-RV

Con estas cuatro combinaciones de oligonucleótidos se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando como molde ADN genómico de la cepa FOP-SP1 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo 2,5 µl de buffer 10X, 10 µM de cada oligo, 200 µM de dNTPs, 10 ng de DNA genómico y 0,5 U de DNA polimerasa (DNA Polymerase bitools 1 U/µl). El perfil del programa de PCR fue: 1 ciclo de desnaturalización de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificación consistentes en 30 seg a 94°C, 30 seg a 58°C y 1 min a 72°C y un ciclo final de extensión de 5 min a 72°C.

La Figura 7 muestra los productos de amplificación obtenidos separados mediante electroforesis en gel de agarosa. En cada caso se obtuvo un producto único de amplificación, de tamaño diferente con cada combinación particular de cebadores: 481 pares de nucleótidos con la pareja específica de FOXG_17028.3, 511 pares de nucleótidos

con la pareja específica de FOXG_13752.3, 661 pares de nucleótidos con la pareja específica de FOXG_18012.3 y 591 pares de nucleótidos con la pareja específica de FOXG_15840.2.

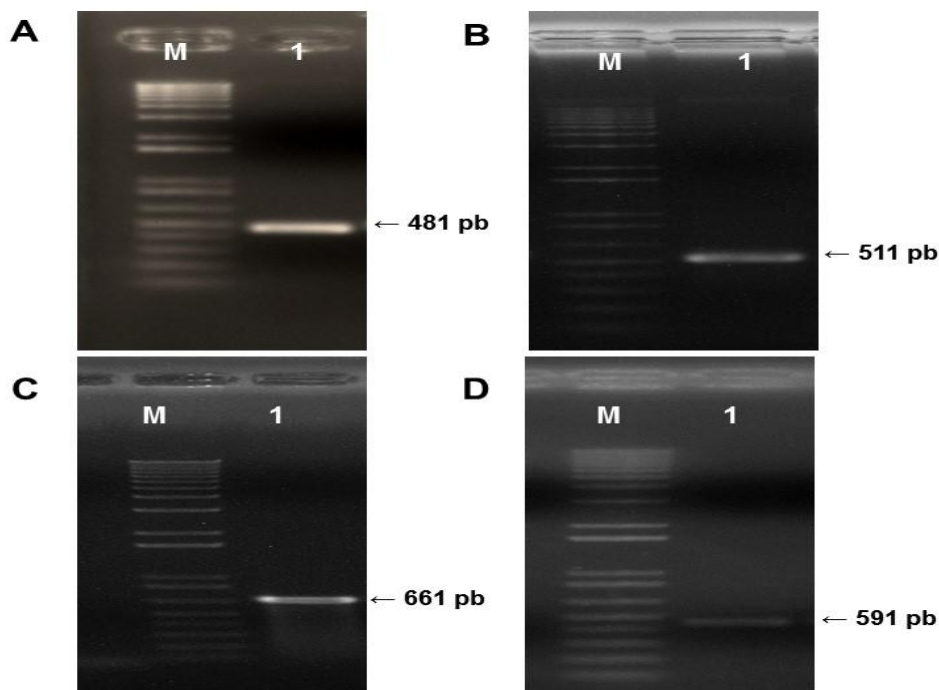


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de secuencias derivadas de la región codificante de los genes codificadores de proteínas de tipo flavohemoglobina utilizando ADN genómico de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP-SP1) y las combinaciones de oligonucleótidos específicas de (A): gen FOXG_17028.3, (B): gen FOXG_13752.3, (C): gen FOXG_18012.3 y (D): gen FOXG_15840.2. En el carril M: marcador de peso molecular 1 kp plus DNA ladder (Invitrogen).

El hecho de que con cada combinación de cebadores se generara un único producto de amplificación, producto de amplificación diferente y específico de cada combinación de cebadores, junto con el hecho de que éstos hayan sido diseñados teniendo en cuenta la secuencia de cuatro genes diferentes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, nos permite proponer que ésta es probablemente la situación también en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* cepa FOP-SP1. Asumimos así inicialmente la existencia de cuatro genes “*FHG*” en el genoma de FOP-SP1, codificadores de enzimas tipo flavohemoglobina, que fueron denominados de la siguiente manera:

- Gen *FHG1*: ortólogo de FOXG_17028.3
- Gen *FHG2*: ortólogo de FOXG_13752.3
- Gen *FHG3*: ortólogo de FOXG_18012.3
- Gen *FHG4*: ortólogo de FOXG_15840.2

3.1.3 Caracterización del entorno genómico de los genes codificadores de flavohemoglobinas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Para caracterizar el entorno genómico de cada uno de los cuatro posibles genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina en las cuatro cepas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* objeto de estudio en este trabajo (FOP-SP1, FOP-SP4, FOP-SP13 y AB82) en comparación con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y para determinar si éstos están presentes en copia única, se llevó a cabo un análisis de hibridación tipo Southern. Para ello se utilizaron como sondas los fragmentos de ADN genómico amplificados mediante PCR con las cuatro combinaciones de cebadores descritas en la sección 3.1.2 de Resultados (ver Figura 7) (marcadas también mediante PCR) que fueron probadas sobre filtros de nylon a los que habían sido transferidos los fragmentos resultantes de las digestiones de ADN genómico de las cuatro cepas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* y de la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI.

La Figura 8 recoge los resultados obtenidos en las hibridaciones llevadas a cabo con cada una de las cuatro sondas. De su estudio se derivan diversas consideraciones de interés.

En primer lugar, en cada caso el patrón de hibridación obtenido es específico de cada sonda, lo que permite proponer que cada sonda detecta una región particular del genoma de las estirpes analizadas y, por lo tanto, que existen cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina en el genoma de las cuatro estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* analizadas, así como en la estirpe 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

En segundo lugar, con ninguna de las cuatro sondas se detecta hibridación cruzada en condiciones de alta astringencia, lo que supone que los cuatro genes, aun teniendo cierto grado de similitud, son lo suficientemente diferentes en su secuencia de nucleótidos como para no ser detectados de forma cruzada en condiciones de hibridación restrictivas.

En tercer lugar, en las digestiones con la enzima *Hind*III se detecta en todos los casos una única banda de hibridación (lo que supone que la enzima en ningún caso corta en la secuencia interna de la sonda). Es posible deducir, entonces, que son genes de copia única y que no existen secuencias muy relacionadas en el genoma de las estirpes analizadas.

Y finalmente, los patrones de hibridación son esencialmente idénticos entre las cinco cepas analizadas en relación con las dos digestiones consideradas en estas hibridaciones. Sólo se detecta un polimorfismo (RFLP) entre los patrones de hibridación de las cuatro cepas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* y el de la cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en la hibridación llevada a cabo con la sonda derivada del gen *FHG1*, el correspondiente a la banda *Bam*HI de 12.300 nucleótidos característica de esta última, de un tamaño ligeramente superior a la banda detectada en la cuatro estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Es interesante destacar que entre las cuatro estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* también se detecta un polimorfismo, tanto en la digestión con la enzima *Hind*III como en la digestión con la enzima *Bam*HI, en la hibridación llevada a cabo con la sonda derivada del gen *FHG4*, y que marca una diferencia entre la estirpe AB82, la única estirpe no patógena, y todas las demás, incluida la cepa 4287 de FOL (Figura 8).

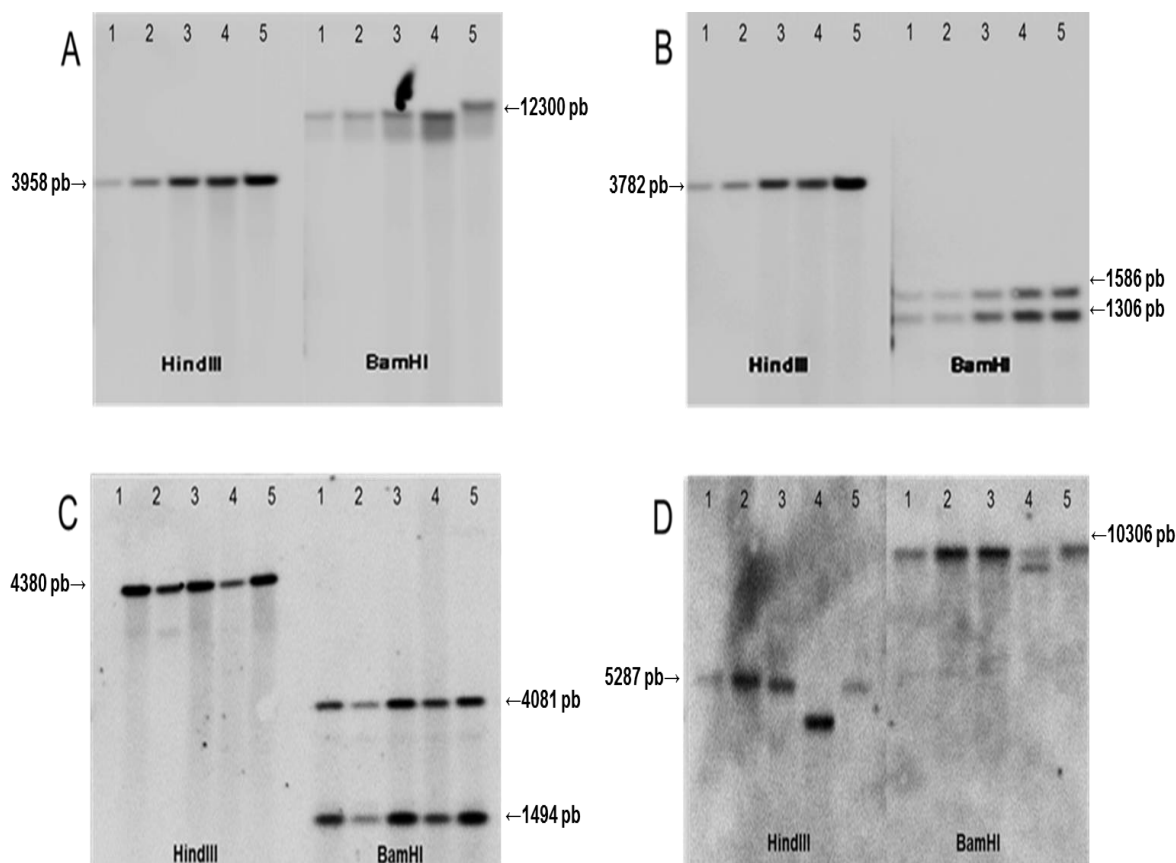


Figura 8. Análisis tipo Southern de los genes codificadores de enzimas flavohemoglobina en las diferentes estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. En la parte izquierda de cada panel se muestran las hibridaciones correspondientes a digestiones de ADN genómico realizadas con la enzima *Hind*III, y en la parte derecha las digestiones de ADN genómico realizadas con la enzima *Bam*HI. A: hibridación con la sonda derivada del gen *FHG1*; B: hibridación con la sonda derivada del gen *FHG2*; C: hibridación con la sonda derivada del gen *FHG3*; D: hibridación con la sonda derivada del gen *FHG4*. Los números del 1 al 5 corresponden a las muestras de ADN genómico de las estirpes FOP-SP1 (1), FOP-SP4 (2), FOP-SP13 (3), AB82 (4) y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (4287) (5).

En resumen, los resultados presentados en la Figura 8 permiten asegurar que el genoma de los cuatro estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* analizadas, FOP-SP1, FOP-SP4, FOP-SP13 y AB82, incluye cuatro genes de copia única codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina. La situación es, por lo tanto, la misma que la descrita en la estirpe de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizada como referencia en este trabajo y cuya consideración nos ha permitido identificar de forma sencilla los genes ortólogos en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* antes de disponer del genoma de esta forma especial.

3.2 Análisis estructural de los genes codificadores de flavohemoglobinas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

En el curso de este trabajo y una vez identificados mediante PCR e hibridación Southern los cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* fue posible disponer de la secuencia completa del genoma de las estirpes FOP-SP1, FOP-SP4, FOP-SP13 y AB82. Estas secuencias fueron obtenidas en el curso de un proyecto de investigación sobre genómica de hongos fitopatógenos que desarrolla nuestro grupo de investigación (AGL2012-39876-C02-01). Un análisis detallado de la secuencia del genoma de la estirpe FOP-SP1 permitió confirmar la presencia en el mismo de cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina, los genes que hemos denominado previamente *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4*. La secuencia de nucleótidos de la región codificante y de las regiones flanqueantes en dirección 5' y en dirección 3' de cada gen fueron rescatadas, revisadas detalladamente y anotadas. Se presenta a continuación la secuencia de cada uno de ellos.

3.2.1 Secuencia de los genes *FHG* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

3.2.1.1 Gen *FHG1* de FOP-SP1

La región codificante del gen *FHG1* consta de 1266 nucleótidos y carece de intrones. Su traducción da lugar a una secuencia de proteína deducida de 422 aminoácidos (Figura 9).

-756	TTCTTTAGTGTAT	ATTACTGCTGATTT	ACCTTTCTCATATTT	TGCAGTTTAAATAT	CTGTGACATGCAAAG
-681	ATATTAAACGTTCA	ATGAACACTAAAACG	TTTATTTTATTATCA	TGTATATTTTGACAC	TACCACTAAAATGTC
-606	TATTAACCTCAGAGCA	GGTTTTATCACAGA	TTCCCAATTTAGAAAT	AGACATTTCTACAAG	GCCGGATGCGATCAG
-531	ACGCGTTTAAATGACA	TATTAAGCAAGTAT	TAGGGTAACCTCA	TCCCACTCGGCCCTG	CTCGGTGCTATTTCC
-456	CGAAAGTTCCCGGAC	AGGTTTCGCGTCTGAC	GCGACAGAGGAGCGT	CACACGTGATCCCTG	AAAACCGAGTTCAGC
-381	CGACAAATTGCCCGA	CGACTCCGGTTCAAC	GCACTGAGGATGATC	GGAGTCTAGTCCCTT	TCGGGAAAGTTCAAT
-306	CTCAGGCGTCATGAT	TCACTTGACTCTGAT	TTGTTAGATCATTGT	ATTAAAGGCCTCTTT	TGAAGCAAAATCCGCG
-231	GAAATCTCACAACGT	CCCACTATATAAAAAG	GAATTTTTCAGAACGC	ATGCTTCATCCTGGC	ATCTACCTATGGGGT
-156	CAAGGATGACAAAGT	CAGGTTTTCACAAGCA	TGAGCAATGGAAAAAT	GTTTCGTTGATCCGC	TATATATATTAACAA
-81	GACATGCCAGCGTTT	CTCGACATTCCTCTG	CATCGCACAGTCAGA	GATTAATTCATCTTT	CTTTAATACCAACTA
-6	TCCGTC				
1	ATGTCGTTAACAAC	TCCCAAGTTGACATT	GTCAAGTCAACAGCC	CCTGTACTCAAGATT	CATGGAGAGACCATT
1	M S L T T	S Q V D I	V K S T A	P V L K I	H G E T I
76	ACATCTCTTGTCTAC	AAGACCTTGATTGGC	ACCTACCCGACCTC	CGCAACATCTTCAAC	CTCAGCCATCAACAC
26	T S L F Y	K T L I G	T Y P D L	R N I F N	L S H Q H
151	GATGGCGCCCAAGCC	AAAGCTCTGGCTGGT	GCTGTGCTCGCGTAT	GCCACCTATATCGAC	AATCCCGAATTTTTA
51	D G A Q A	K A L A G	A V L A Y	A T Y I D	N P E F L
226	GCATCTACAATCGAA	CGTATTGCCAGAGA	CATGTCAGTCTGAAG	GTTACGGAAGATCAA	TATGCTCTTGTGGC
76	A S T I E	R I A Q R	H V S L K	V T E D Q	Y A L V G
301	GAGCAGCTTATCAA	GCCATTGGAGAAGTA	CTAGGCGATGCCCTC	ACGGATGACATCGCT	GATGCGTGGACGGCT
101	E Q L I K	A I G E V	L G D A L	T D D I A	D C W T A
376	GCCTACGGTCAACTA	GCCAATATCTTTATC	AACCGCGAGAAGCAA	TTGTATCAAGAGGCC	GGCGAGTGGGATGGC
126	A Y G Q L	A N I F I	N R E K Q	L Y Q E A	G E W D G
451	TGGAGGAAGTTCAAG	ATTGCTAAGCGTGAG	AAGGAAGCAATCTC	ATCACAAGTTTTCAT	GTCGCTCCATCTGAT
151	W R K F K	I A K R E	K E A D L	I T S F Y	L A P S D
526	GGCAAGACACCCTTG	CCTACGTTCCGTCCT	GGTCAGTATGTCAGC	CTCCGAATCAATGTA	CCTGAACCTCGGTGGC
176	G K T P L	P T F R P	G Q Y V S	L R I N V	P E L G G
601	ATCTTCCAATGTCGT	CAGTACAGCATGAGT	CAGGCACTCAGAGT	GACTACTACCGAGTC	AGTATCAAGAAGGAG
201	I F Q C R	Q Y S M S	Q A P H S	D Y Y R V	S I K K E
676	AGTTTCGCTCTGGAA	GGAAAAGACGAACCT	TTGCCCGGCACCGTC	TCCAATCTCCTACAT	AACCATATCAGGTT
226	S F A L E	G K D E P	L P G T V	S N L L H	N H Y Q V
751	GGAGAGGAGATTGAG	ATGACATATCCTCGT	GGCGAATCTGGCTT	GACATCGAAGATGAT	ACAAAGGCAAATGCA
251	G E E I E	M T Y P R	G E F W L	D I E D D	T K A N A
826	CCTCTCATTCTAATA	TCGGCGGGCGTTGGT	GTTACACCTTTGATG	TCCATGCTCGAGTCA	GTTCTCAGCTCGCCT
276	P L I L I	S A G V G	V T P L M	S M L E S	V L S S P
901	CAATCGAAGATGGCA	AACAGACCTATCCTC	TGGCTCCACGCAGCT	AGAACATCGCAGCAC	ATGCGTTTTCGAACA
301	Q S K G M	A N R P I L	W L H A A	R T S Q H	M A F R T
976	CATGTTAGCATGTGA	TCGGCGGGCCACGAG	AACGCTGAGACTCTT	ATCTGGCTCAAGAAC	TGGGCCCCAAACGAT
326	H V S S S V	S A G H E	N V E T L	I W L K N	V A Q N D
1051	AAGAAGGCGGAAGAC	TATGATTTCGAGGGA	CGATTAGACCTCGAT	GTTGTGTATCAAGCA	AAGAAGGAAGAATTG
351	K K G E D	Y D F E G	R L D L D	V V Y Q A	K K E E L
1126	GAAAACAAGGGATCT	CAATTTTATTTTGT	GGGCTGCTTCTTGG	ATGGTAGCAACAAGA	GATAAGCTACAAAGT
376	E N K G S	Q F F I C	G P A S W	M V A T R	D K L Q S
1201	TTGGGGGTTGCGCAC	GAGCAAATCAACATG	GAGCTCTTTGGAAT	GGCAGTATCAATCAG	GAGTGA
401	L G V A H	E Q I N M	E L F G T	G S I N Q	E
1267	GGGACATATGACTGA	ACAATTAGACTAGGC	AACAACAACTAGAA	TGTAGAATTAGACAA	TTGACCATTTAGACT
1342	TTTCTCTCTAAGGT	ATCTTCCCAAAGAGT	CTTGAAAACAACAGG	CAGTAATAGGGTCTG	AGGCCATATAAACAT
1417	CAGACTTGGAAAACG	ATCTTCTGGACCTTG	GACTCGTTGAACAGG	TCGTAGCCTCGAAT	GCCTCTGATAGAGGA
1492	AGAATGTTGTGCAAT	AGGAAGCTGTACTCA	GTCAGTTCAAGCCAG	GCTCTTTGAGCATAT	CATTGACTCAAGAGT
1567	ATGCATACCTGAGAG	AATCCTGTTCTTGCT	TGAGAACTTCCATTG	CTTCAGAAAAGATAC	TTCTTACTGGACACC
1642	GTCCCATTTGCAAAAC	GAACATTTTACTAA	ACTCAATTAGCTTCA	TTTAATATAACAAAAG	AAGTTGGACCTCACT
1717	TGTACGCGTCACTGC	CTGACCAAGGGATCT	GTTGCATGTTAGTAG	AATCCATAGCTGTGC	AAAGTATCATGACAC
1792	ATACCTCTGCGTTAT	GGACACCAATGCTGC			

Figura 9. Secuencia de nucleótidos del gen *FHG1* y secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. La secuencia de la región codificante (1266 nt) está representada en negro y numerada a partir del codón de iniciación ATG. Los codones de iniciación y terminación de la traducción se muestran subrayados en color rojo. La secuencia de aminoácidos de la proteína deducida se muestra en color rojo debajo de la secuencia de nucleótidos. Se incluyen 756 nucleótidos de la región 5' flanqueante y 555 nucleótidos de la región 3' flanqueante. Las posibles cajas CAAT y TATA identificadas en la región promotora se presentan marcadas en color rojo y subrayado.

3.2.1.2 Gen *FHG2* de FOP-SP1

La región codificante del gen *FHG2* consta de 1247 nucleótidos y carece de intrones. Su traducción da lugar a una secuencia de proteína deducida de 416 aminoácidos (Figura 10).

-722	TGTCACAGGTTTCAA	TATTCCAAGCTCGTG	GCATCAAAAATTTAA	GGTCAAGAGCTGGGT	ATTTCCGCATCTCCG
-647	CGAAGTGCAAGAGTT	TTCGCTGAGCAATG	AGGCCCTTTCAGCACG	AAATAACTGACCTGT	TTGAGCCATTTGACTG
-572	TCAGACAACTCAATG	CAACGTATGCAAAAC	CATGGCACAAGGGTA	TTTGATCGTCTCTGC	TCTACCCTGCCTCTC
-497	CCAAACTTACACGCA	AGACGGCGGGGCATT	TGCATGAAGGAACGT	CAAGCCTGGGGATAT	AGTTGGGGCCCTGCAT
-422	TTCCATCAGTCTGGA	TCCGACGAAACATAT	TAACAAATGTAGTAA	CTACATAAAAAACGG	GATCCAAAAAAGAA
-347	GCTCCAGCGCAATC	CCGGTGACGTGCCGC	TCACCCCGCGGAGAT	GCTCTAACCACAAACC	ATCAGACCACTATCA
-272	AGATCGGTCCGTGAT	CCAGGAACCCACACG	GCGAACGGCGCTGTA	TTCCGGGTCCATGAGC	TATTCTTTTCGCATG
-197	GCATGATGCTTGGAG	TTGAGAGTCATGGAG	AGCGTAATGTTCTTT	CTCCGCGCCATGACT	GGTTCTCCGACCTGG
-122	<u>TATA</u> TAAAGAGTCTA	AAGGTTGGCCAGTTT	GACGACATTATTCTC	AGCATCATCTAGTAT	ATCAACACCACAACA
-47	ACCTCTCAACTCCTC	CTCGCATCTCTTCAA	CACCAACAAACAGT	ACA	
1	<u>ATG</u> GCTCTCACCGCA	GCACAAGTAGCAATT	GTGAAGTCAACTGCT	CCCATCCTGAAGGAG	CATGGCAAGACTATC
1	M A L T A	A Q V A I	V K S T A	P I L K E	H G K T I
76	ACCACCATTCTTCTAC	CGCAACATGCTCGGC	GCCCATCCTGAGCTC	AAGAACTACTTCTCT	CTGCGAAACCAGCAG
26	T T T F Y	R N M L G	A H P E L	K N Y F S	L R N Q Q
151	ACCGGAGCTCAACAA	GCTGCTCTCGCCAAC	TCTGTCTCTCGCTAC	GCCACATATATCGAC	GACCTTGGCAAGCTT
51	T G A Q Q	A A L A N	S V L A Y	A T Y I D	D L G K L
226	TCCCAAGCGTTTGAG	CGCATTGCTCACAAG	CACGTTTCTCTCTTC	ATCAAGCCAGAGCAC	TACCCCATCGTTGGC
76	S H A V E	R I A H K	H V S L F	I K P E H	Y P I V G
301	ACACATCTCATCGGT	GCCATTGGCGAGGTT	CTCGGTCTGTCTTGG	ACGACTGAGATCAAG	GACGCTTGGGTGTGCT
101	T H L I G	A I G E V	L G S A L	T T E I K	D A W V A
376	GCTTATGGCCAGCTC	GCTGATATCTTCATC	CAGCGCAGGGTCAG	ATGTACGAGGCTGCT	GGCGAATGGAACCTG
126	A Y G Q L	A D I F I	Q R E G Q	M Y E A A	G E W N S
451	TGGCGCAAGTTCAAG	ATTGTCAAGAGGAG	GCTGAGAACGACTCT	GTTACTAGCTTCTAC	CTTGAGCCTACTGAT
151	W R K F K	I V K K E	A E N D S	V T S F Y	L E P T D
526	GGCAAGCCTCTGCCC	AAGTTCCTTCCCGGA	CAATACGTCAGCGTG	CAGATTCCCATCCCT	GAGCTTGATGGTCTT
176	G K P L P	K F L P G	Q Y V S V	Q I P I P	E L D G L
601	CTTCAGAGCCGGCAG	TTCAGTCTGAGCGAG	GCCCCCTGGCACCAAC	CACTACCGCATCAGT	GTCAAGCTTTCAGGGT
201	L Q S R Q	F S L S E	A P G T N	H Y R I S	V K L Q G
676	CCCACTGAGGAGCCT	GCTGTTGAGGATCTC	GCTGTGGCAAGATT	GCTGGTCTTCTCTCC	ACAAGACTTCACAAC
226	P T E E P	A V E D L	A A G K I	A G L L S	T R L H N
751	CGTTATAGTCTCGGT	GACGAGCTTGAGCTG	AGCCCTCCTGCTGGA	GAGTCTCCCTTGAC	CTTGCCGACACTTCT
251	R Y N V G	D E L E L	S P P A G	E F S L D	P A D T S
826	GCTGCCAAGAGCCT	CTTGTTCTTCTCTCC	GCTGGTGTGGCGCC	ACTCCTCTTGTCTCC	ATTCTCGACTCAGTT
276	A A K K P	L V L L S	A G V G A	T P L V S	I L D S V
901	CTCCAATCCCCAAC	GCCTCACCGCCATC	ACCTGGATCCACGGT	GCTCGCTACTCTGGC	TCTACCTGCTTCTGTT
301	L Q S P T	A S R P I	T W I H G	A R Y S G	S T C F V
976	CCCCATGTTCTCGAC	TCTGTCAAGAACGAC	GAGAACATCACCGCC	AAGATCTTCTCTGAG	GATGTCAAGAGGGT
326	P H V L D	S A K K H	E N I T A	K I F L E	D V A G E G
1051	GACCAGTACGACTTT	AAGGGCGAGATCGAC	CTTGCCAAGCTCCAG	AAGGAACAGCTTCTC	CAGCTCGAAAATGCT
351	D Q Y D F	K G E I D	L A K L Q	K E Q L L	Q L E N A
1126	GATGCTGAGTACTAC	ATCTGCGGACCTGAG	GACTGGATGGTTAAT	GTCAGGGCATTCCTC	GAGGAGAACGGTGT
376	D A E Y Y	I C G P E	D W M V N	V R A F L	E E N G V
1201	CCTCGTGAGCGCCAG	CACCTTGAGCTCTTC	AAGACTGGTGAT	<u>TAA</u>	
401	P R E R Q	H L E L F	K T G D	*	
1276	AATAGCGATGCGCTG	CATATGATGGATTTTC	CTTCTATTTTAATCGG	TTTATGTGCTGGCAT	GTCGAGGGCGTTGAG
1351	GATCTGCTGTGCTCT	TTTGTGACGCGGATG	TTTTGTGTTGCTCAGA	TCGAAGAAAGAGTGC	ATATACTAGATACTA
1426	GATACTAGATACCAC	CCTAGAAAAACAAAA	GAATCATTTCAACCTA	TCTTCGCTTCTATCT	CAATACCATCAAATG
1501	TAAAGAACGTGAGCG	TGTGTCTTGGTAAAT	AGCCGACGTATAAGT	ATCACATGTAGTACA	GTGAGACGAGCCACG
1576	TGTAAAAGTAAACGAG	AGACAATAGCAACAG	CGTGTGTGTGAGTGT	TTTATCTTCCAGGCG	AAGGCTTGAGTTACG
1651	ACTGGACGCCACCGT	CCAATGTCTCGCCTG	TCTGTGGACACGTT	GTATGCAGTCACTTT	AAACGATGATGGGGG
1726	AGGAAAAAGTAAAT	ATTGATACCCTTGTC	TGTGGGGATGAGATC	GGATGATTAACCGAT	CGAGATTGAGTTCGG
1801	GGAGGTATTACGTAT	TAGTTTTTGGGTGGAG	AATGGGGATGATCTG	AGGTGATATGATGGG	AGATGTGATGAGAGG
1876	TGATCACGAGAAGTG	GTGTGGTTGTATGCA	GTTTGTATTTAGAGA	GTAGAGGACCATACA	GCATAGAAGTTATAC
1951	GAATGCATCAGCCAA	AGCAGACTACTGTTG	CCGTTTCAAACAGTG	ACTGGCCAAAATTGC	AATAATTGACTCAAC
2026	TCAATAACAAATCGC	TTTCGTCTTCTCTCGC	CTCCCCGCAACTGCA	GCTCGCCGACGACC	CTCCAATGAAGAACA
2101	CTGTGCAATCGATAT	ATCAAT			

Figura 10. Secuencia de nucleótidos del gen *FHG2* y secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. La secuencia de la región codificante (1247 nt) está representada en negro y numerada a partir del codón de iniciación ATG. Los codones de iniciación y terminación de la traducción se muestran subrayados en color rojo. La secuencia de aminoácidos de la proteína deducida codificada se muestra en color rojo debajo de la secuencia de nucleótidos. Se incluyen 723 nucleótidos de la región 5' flanqueante y 846 nucleótidos de la región 3' flanqueante. Las posibles cajas CAAT y TATA identificadas en la región promotora se presentan marcadas en color rojo y subrayado.

3.2.1.3 Gen *FHG3* de FOP-SP1

La región codificante del gen *FHG3* consta de 1365 nucleótidos y carece de intrones. Su traducción da lugar a una secuencia de proteína deducida de 456 aminoácidos (Figura 11).

807	TGACTAAAAAGAGAG	ATTTCTTGTGATTGG	GTTACCGAATCTAGA	ATCTAGATCAGCCTC	GTTTCTCACCTGTTT
-752	CTGTCTCTCGGAACAT	ATTCATAGCCAAGAC	TTCCTTAAAAGATTTC	GTTCTCAGTGTCCCT	TCAGTGGAAAGCCGCC
-657	GGGCACTCCAAAAA	GCAAGGAGAGCCTGG	AGCTTACAGGGCCCG	ACCCCACTAACAGAA	AACCTCCACCCACCT
-582	AAAGGGAACTAACAA	TGGATCCCAGCTGTT	CTATCGTACGACTTC	CTGAGCTTGGATTTC	CCAACATCCATCCAC
-507	TTGCGCTTTTACTTTT	CACCTCTCAGTTAGAT	ACACCCTCTATCGCC	TGGGGGTAGTGCTAG	GCCTACCACGAGGAA
-432	TAGACGGCTTGTGGA	GAAGCCCGAGTTTTC	TTTCTTTTCTTTTTC	TCTATGGCCATGGTT	ATAATCTCTGTTTGT
-357	GGGTGTATCACCCCG	TCCACTCTAATTCAA	CTGGGGGGCTGTGAT	ATCTCAGTATCCATG	CCATACCATGCCATG
-282	CCCTTGCTGTGTCAT	GGCCATGAGCCATGA	GGAGGAGGAGAAGGA	GGATATAATATCTGG	GGACAACCTCCCTCTC
-207	AGACTCATCTCTCGA	CTGACGAACTCTGCT	TCATTACAACATCTC	ATTCTCTACTCATC	TGCTACTCTACCAAT
-132	CTCGACATATACAGC	AGTTACACGAAGCAT	TGTCGAAATTACTCA	AGACTCTGCTCTATT	CATAATCAATCTCAC
-57	CCTTCTTAGAGGTGT	CTCTTACTACTACTT	CAACTGTAGTACCTC	ATACTCTTCACA	
1	ATGCGCTCTGTCATAT	CAACAAACCAGGCTC	ATCCGGGGCAACCATC	CCCGCCCTCACCGAC	CACGGAGAGCGCATC
1	M A L S Y	Q Q T R L	I R G T I	P A L T D	H G E R I
76	ACCACCATCTTCTAC	CGCAACATGCTCCGT	GATCACCCCGAGCTC	AACGACTACTTCAAC	ACTGTCAACAGGCC
26	T T I F Y	R N M L R	D H P E L	N D Y F N	T V N Q A
151	AACGGTTCGCCAGCCT	CGTGCCCTCACCGCC	GTCATCCTCAGCTAC	GCCAACAACATCAAC	CACATTACAGAGCTC
51	N G R Q P	R A L T A	V I L S Y	A N N I N	H I T E L
226	ATCCCAAGATGGAG	CGCATGTGCCACAAG	CAGTCTCCCTAGGC	ATCAAGCCAGAGCAT	TATGCCATCGTCGAG
76	I P K M E	R M C H K	H C S L G	I K P E H	Y A I V E
301	AAGTATCTCATCGCT	GCCTTCGAGAAGTC	CTCGGTCTGCCATG	ACACCCAGGTGAGA	GAGGCTTGGATGAAG
101	K Y L I A	A F A E V	L G P A M	T P Q V R	E A W M K
376	GCATACTGGATGCTT	GCCAAGATGCTCATC	GGTCGTGAGGCTCAG	CTCTATCGTGACTTT	GGCAAGTGGCAGGGC
126	A Y W M L	A K M L I	G R E A Q	L Y R D F	G K W Q G
451	TACCGTAAGTCCGT	ATCGAGAAGAAGTT	GAGGAGTCTGATGAT	ATCTACTCCTTCTAC	CTCGTTCTGTCGAC
151	Y R K F R	I E K K V	E E S D D	I Y S F Y	L V P V D
526	GGAAAGCGTCTTCCT	CCCTTCAGCCCGGC	CAGTATGTTTCTGTT	CAGGTACCCATCGCC	GACAAGGGCTATGTC
176	G K R L P	P F R L P	Q Y V S V	Q V P I A	D K G Y V
601	CAGTCTCGCCAGTAC	TCCCTGAGCGAGGCT	CCTCGACCTGACTAC	TACCGCGTTACCGTC	AAGCGAGACGAGGGA
201	Q S R Q Y	S L S E A	P R P D Y	Y R V T V	K R D E G
676	CTTCACATGACCCGC	AGCGGTGATATCTC	GGAGGGTGCCTCTC	AACCCCGGTGTTGTC	TCCAACCTCCTTATC
226	L H M T R	S G R Y L	G G D A L	N P G V V	S N L L I
751	GACATGAAGGACGAG	GGTGATATCGTTGAG	TTGACTCCCCCTGCT	GGCGAGTCTACCTC	GACATGTCCAACCG
251	D M K D E	G D I V E	L T H P A	G E F Y L	D M S N T
826	TCCAACGTTCCCATC	GTCCTCATCTCTGCC	GGTGTGCGTGTCACT	CCCATGATGTCCATC	CTCAACACCGTTTCC
276	S N V P I	V L I S A	G V G V T	P M M S I	L N T V S
901	GAGCGCCAGCTCAT	CGTCCCGTCTCCTGG	ATCCACGGCTCCCGC	CGCTCCGTTCCCTTC	TACGACCAAGTCCGC
301	E R Q P H	R P V S W	I H G S R	R S V P F	Y D Q V R
976	CGTATCGCCCGTAAC	CGCCCGAGCTTCCGC	ACCAATATCTTCAAG	ACCCATCTCGCCGAG	TCCGATGTCTACGGC
326	R I A R N	R P S F R	T N I F K	T H L A E	S D V Y G
1051	GTGACATACGACCAC	GACTTCCGATGGAT	CTTGCCAGGTCGAC	AAGGAAGACCTCTAC	CTTTGCAACAGCTCT
351	V T Y D H	D F R M D	L A K V D	K E D L Y	L C N S S
1126	ACCGAGTATACAT	TGCGGTCTGAGCAG	TTCATGCTCGAGATG	GCTGAGTATCTCAAG	GCTCAAAAGGTCGAT
376	T E Y Y I	C G P E Q	F M L E M	A E Y L K	A Q K V D
1201	GCCCCCTCGCATGCAT	TTTGAGCTCTTCAGC	ACTGGTGACATGGAG	TTCAAGGTGCATACC	CTGAGCATCGGCTCT
401	A P R M H	F E L F S	T G D M E	F K V D T	L S I G S
1276	GGGTCAAGGGCAACT	TCCATCAACAGCGAC	GAGGCCAGATGCCCT	AGCTCTGGAGCCATC	TCTACGAATGGTGCT
426	A S R A T	S I N S D	E A R C P	S S G A I	S T N G A
1351	ACTTGCCCTTCTGA				
451	T C P F *				
1366	GTTTGGACCATATTT	AAACTGAACGAACAA	AAACATAAAATTATT	TACGGGGCATCTCTC	GGTCATGGGCTAGAT
1441	TACGGGAAGTGATGA	GGCGTTACGGATCCG	CGGCATATCTTATTTC	TTTATTGTTGTGTCT	CTTGTTTACAAGATTTC
1516	CCTTTGATGACAAAT	ATTCTCTCTGTCAAA	CCATAATACATGTTTC	ATGTTCTACTTCTAC	ACTTCAACATTAGGG
1591	CGTTTCGACGACACA	TTGGGCTTATCTGAA	TGAAACGGCGGGGAAG	GAAAAGTCCGAGATT	TGGGCTGGGATTGGG
1666	AGGTGTCTAGAAAGC	GAAAAGAGAAATCAA	CAGAATTTTCATTGTT	CTACCTGAATAAACA	AACATGCTAAAAACA
1741	TGATACTCCATCTAT	ATAACCACAACATA	CCGAATAATGAGTGA	ATAAATTGGTGTGTA	CGTGGTCCCGTACTC
1816	GCTTCTCAAGCGATC	CCCCGTCTTTGCCCG	CTACGGTGGCATGGC	AGGGTAGCGTGGCCA	AAAAAACACCTGAA
1891	ATCAGGAGACAGATG	ACGAACAAAGGAAAA	AACCGCATATGCTAG	TAAAATATAGGAGAA	AAGAAACGACAACAC
1966	CGCTGTTC				

Figura 11. Secuencia de nucleótidos del gen *FHG3* y secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. La secuencia de la región codificante (1365 nt) está representada en negro y numerada a partir del codón de iniciación ATG. Los codones de iniciación y terminación de la traducción se muestran subrayados en color rojo. La secuencia de aminoácidos de la proteína deducida se muestra en color rojo debajo de la secuencia de nucleótidos. Se incluyen 807nucleótidos de la región 5' flanqueante y 609 nucleótidos de la región 3' flanqueante. Las posibles cajas CAAT y TATA identificadas en la región promotora se presentan marcadas en color rojo y subrayado. La posible secuencia de poliadenilación AATAAA se muestra en color morado y subrayada.

3.2.1.4 Gen *FHG4* de FOP-SP1

La región codificante del gen *FHG4* consta de 1290 nucleótidos y carece de intrones. Su traducción da lugar a una secuencia de proteína deducida de 430 aminoácidos (Figura 12).

-741	ACGGAAGATTCTGGC	CAGTGAACATATAAT	AGTGACATGATCACA	CCACTTCAAGCTCCA	GAGTGCAGAGGGAAGC
-666	ATTAGTATCGGAAAG	GAAGCTCCGGCTTTG	AGCGCTATCAGAGG	TTAAAAATCAAGTCG	TGTTAAGTCTCTGGT
-591	TATCCTGTCCCTAAA	<u>TCAAT</u> TCATTAACCA	AAGAAAAACGTAAAG	CTCTATTAACAGTTA	<u>TATA</u> ACTCTCTAAAG
-516	GAATACACCGTAACC	CAGATGTAATCGAAT	AGACAGAA <u>TATA</u> CTC	GTTTTGTATCGAAAA	TGGTCTGATCGGCTC
-441	CCTGTATGTAACATG	GCGTTTTGCGCAAGC	AGAAGAGGTTAATCA	CAGAGTAAAGGTTAG	CTTCTATT <u>CAAT</u> CCC
-366	AAAATTATGTTACTA	AGCGC <u>TATA</u> ATCAAA	GTGAATTCAAGGGTT	AGCACTACCGCATAG	GTGTCTGTTTTGGGG
-291	TTTCTTGCCGAGGTA	GCCGGGCGAGGTAAA	GGTAGTCATTTTAC	ACTGCTGGTCATCCA	CTTAGTATGTGAAAT
-216	AATGTAATCAAGAAA	GGAAGCCATTGGTAC	AAACCACTCGTGGAT	GATGTTAGTGAGGTC	<u>AATA</u> TGTGTAACGT
-141	CAAATTCATTATGG	CATCATATGGCAGTC	CATTGGACGCCTCCG	CACGCTATGCCAACT	ATAAATCTCCCCGCA
-66	GCAGCTCAGATGAC	CTTGAAATGAATGCA	TTCATAGCCATTGCA	ACCGGCCAAAAATAA	TTCAAC
1	<u>ATG</u> CTGGCTCGGACC	ATTATCTGGCGTGCT	GGACGCGGGGCGCTC	TATCAGCTGCATCGA	AGAACGTATGTCTCG
1	M L A R T	I I W R A	G R G A L	Y Q L H R	R T Y V S
76	ACCGCACTGACTCCG	GAGCAGATCAAAAGTC	GTCCAATCGACCATA	CCCGCACTGGAAAAA	CACGGCGTCGAGATT
26	T A L T P	E Q I K V	V Q S T I	P A L E K	H G V E I
151	ACAACGCTCTTCTAT	CGCCAATTGCTCAAT	AAACACCTGAGCTC	AAGAACATCTTCAAC	ACTGCCCATCAAGAT
51	T T L F Y	R Q L L N	K H P E L	K N I F N	T A H Q D
226	ACAGGCGAGCAGCCA	GCCGCCCTCGCGCAC	GCCGTGTGGGCATAT	GCCGCCAATATTGAG	AACCCCGATGCCATG
76	T G E Q P	A A L A H	A V W A Y	A A N I E	N P D A M
301	AAGGCAGCCATTTC	CGCATTGGACATAAA	CATGCGAGCTTGGGA	GTTACCGCAGACCAA	TATACGTCGTCGGC
101	K A A I S	R I G H K	H A S L G	V T A D Q	Y T V V G
376	CAAGGGTTACTCTCG	GCGATCAAGCAAATC	CTCGGGGACGGAGTT	AATTCTGAAGTCTTG	GATGCTTGGGAAGCT
126	Q G L L S	A I K Q I	L G D G V	N S K V L	D A W E A
451	GCATCCGCAACTC	GCCGAGTATTTTCAT	AATTTTGAGGAAGGA	TTGTATCAAGAGGCC	ATGGCGACACCCGGC
151	A Y R Q L	A E Y F I	N F E E G	L Y Q E A	M A T P G
526	GGCTGGAAAGGATGG	CGCAAGTTCTTCATC	TCTGACAAAGTGAGA	GAGAGCGAGGAAATT	ATCTCATTCCATCTC
176	G W K G W	R K F F I	S D K V R	E S E E I	I S F H L
601	ACGCCAGCCGACAAG	GGAGCCCTGCCATCC	TACAAGCCTGGCCAG	TTTGTGAGCATCCGA	TGCTTTAGCCTGAG
201	T P A D K	G A L P S	Y K P G Q	F V S I R	C F M P E
676	CTTGGGGCATACCAG	CCCCGGCAATATAGT	CTATCTGACGTGCCA	AATGGAAAGTATTTT	CAAATTTCCGTTAAA
226	L G A Y Q	P R Q Y S	L S D V P	N G K Y F	Q I S V K
751	AGAGAAATTCGCATCG	GATATAAAACCGGCC	GGCCGAGTATCCAAT	GTTCTTCACGATTTCG	CTGCCGAGGGGTTCG
251	R E F A S	D I K P A	G R V S N	V L H D S	L P E G S
826	GAGGTGGATATCAGC	ATGCCATTTGGTGAT	TTCGTCTTGACATC	AACAATACAGCGCCC	GTGGTGTATTATAGC
276	E V D I S	M P F G D	F V L D I	N N T A P	V V F F I S
901	GGAGGATTCGGACTG	ACACCTATGATGGCA	ATGCTGAAGAAGATA	ACGGAGGAAGGAAAA	CCGAGGAAAAGTGGTG
301	G G V G L	T P M M A	M L K K I	T E E G K	P R K V V
976	TTATCCATGCTGCA	CGCAACTCACGAGTC	CATGCTATGAAAGAT	ACCCTCATCGAGATT	GTGAGAGACCATCCG
326	F I H A A	R N S R V	H A M K D	T L I E I	V R D H P
1051	GAAGTCACCCGCCCTT	GTTTACTATGAGCGG	GTTGAAGAAGACGAT	ATATTGGGGCTTGAT	TACGATCACGAGGGG
351	E V T R L	V Y Y E R	V E E D D	I L G L D	Y D H E G
1126	CGCGTGGACCTTGCA	GAGGTTAAGCATAAG	GTGATTCTGCCAGAA	GCGAATTACTACATC	TGCGGGCCACCGCGG
376	R V D L A	E V K H K	V I L P E	A N Y Y I	C G P P P
1201	TTTATGAATTCACAG	AGCCAGGCACCTTCGG	GATTTGGGTGTTGAG	GAGAAACACATTTCAC	ATGGAGGTATTTGGG
401	F M N S Q	S Q A L R	D L G V E	E K H I H	M E V F G
1276	TCGCCAACTTC <u>TGA</u>				
426	S P T S *				
1291	TGCTATATGGAAGTT	TCCCTTATCTACAA	CAGCTTAACTTTTAA	CTTAACCCCGCAATT	CCAATATTCCCTGG
1366	CCAGGCTATCGCGAG	ATTGCCAAGCCTGAG	TCTCAGCTCTCTGAG	TTCACGACTGGTTGC	GCTCTGGCAGATTGT
1441	TGCGTTCGGTTATAAG	TACCCAAGCCCCAGC	ACTGCTTTCTTTGTC	ATACCATTAGTAGTA	TACAGTCAGAATTAG
1516	TGTCTCTCATTGTCT	TTCTGCTACGTGAAC	TTGAGCGATCATCAT	CAAGGGACTGAGGTA	CTCTAATGTGTTCTC
1591	TATTGGTGACGATAC	TTCAAATGATCTGAT	CGGACTGATTGATCG	ATGTAAACTGCTAG	TCCTACTAAAGGGAA
1666	ATGTCCTTATTGTC	ACGGGTAGATCAATA	TCTGGGGTCTATGCC	ATTGCGGATCATGAT	AATCCTCATTTGGAT
1741	CAGGCCATTAAGTTC	CCAATCTACAAGCCT	TCCAGTAATCTGCGC	AAATGGTTTGACAAG	ATAAGCAACTCTGCT
1816	TACGTGATGCTGAAG	AGGTGAAGTTGCAAG	ATGTCATAATTTGCA	ATGAATGAGGAGTCT	GATCCACTGGACTCT
1981	GTGTGAACGCCGACA	ATTTGACAGTTTGAT	CTGATACTTCACATT	AGCAGTGACTAAAAA	CACAGATAG

Figura 12. Secuencia de nucleótidos del gen *FHG4* y secuencia de aminoácidos de la proteína deducida. La secuencia de la región codificante (1290 nt) está representada en negro y numerada a partir del codón de iniciación ATG. Los codones de iniciación y terminación de la traducción se muestran subrayados en color rojo. La secuencia de aminoácidos de la proteína deducida codificada se muestra en color rojo debajo de la secuencia de nucleótidos. Se incluyen 751 nucleótidos de la región 5' flanqueante y 669 nucleótidos de la región 3' flanqueante. Las posibles cajas CAAT y TATA identificadas en la región promotora se presentan marcadas en color rojo y subrayado.

3.2.2 Análisis de la región codificante de los genes *FHG*

Estructuralmente los genes *FHG* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* de FOP-SP1 son muy similares: todos ellos carecen de intrones y las correspondientes regiones estructurales tienen tamaños muy parecidos entre sí (1266, 1247, 1365 y 1290 nucleótidos para los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* Y *FHG4*, respectivamente) y similares a los tamaños de la regiones codificantes de otros genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de hongos (Gardner *et al.*, 2005).

Cuando se comparan las secuencias de nucleótidos de los genes de *FHG* de FOP-SP1 con los genes ortólogos de FOL se comprueba que en todos los casos existe un nivel de semejanza muy elevado, como cabe esperar tratándose de estirpes del mismo complejo de especies, si bien correspondientes a formas especiales distintas, aunque variable según el gen. Se detectan 17 sustituciones nucleotídicas cuando se comparan el gen *FHG1* y el gen FOXG_17028.3, 4 cuando se comparan el gen *FHG2* y el gen FOXG_13752.3, 12 cuando se comparan el gen *FHG3* y el gen FOXG_18012.3 y 20 cuando se comparan el gen *FHG4* y el gen FOXG_15840.2.

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los cuatro genes de *FHG* de FOP-SP1 y FOP-SP4 indica que el grado de identidad entre ellos es superior al 30 % y que los genes *FHG1*, *FHG2* y *FHG3* están más relacionados entre sí que con el gen *FHG4* (ver Tabla 9).

Tabla 9. Porcentajes de identidad entre las secuencias de nucleótidos de las regiones codificantes de los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* Y *FHG4*.

	<i>FHG1</i>	<i>FHG2</i>	<i>FHG3</i>	<i>FHG4</i>
<i>FHG1</i>	100 %			
<i>FHG2</i>	48 %	100 %		
<i>FHG3</i>	35 %	47 %	100 %	
<i>FHG4</i>	33 %	35 %	33 %	100 %

3.2.3 Análisis de las regiones promotora y terminadora de los genes *FHG*

En la Tabla 10 se presentan las posiciones en las que se identifican secuencias relacionadas con el control de la transcripción de forma general, tanto en la región promotora (cajas TATA y CAAT) como en la región terminadora (secuencia consenso de señal de poliadenilación “AATAAA”) de cada uno de los cuatro genes *FHG*. Es posible destacar que en las regiones promotoras de los cuatro genes se identifican varias cajas TATA y CAAT en localizaciones compatibles con su posible función reguladora de la transcripción. En la región terminadora, por su parte, sólo se identifica la secuencia consenso señal de poliadenilación característica de organismos eucariotas (Heidmann *et al.*, 1992) en el caso del gen *FGH3*. Debemos recordar que esta secuencia consenso señal de poliadenilación no está siempre presente en todos los terminadores de los genes de hongos, en los que otras secuencias relacionadas (AATAAT, AATATT, AATACT) pueden desempeñar la función de señalización del lugar de poliadenilación, y que sí se identifican en la región terminadora de los genes *FHG*.

Tabla 10. Ubicación de las hipotéticas cajas TATA y CAAT en la región promotora y secuencias consenso señal de poliadenilación reconocidas en los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4*.

Secuencia consenso	Gen <i>FHG1</i>	Gen <i>FHG2</i>	Gen <i>FHG3</i>	Gen <i>FHG4</i>
Caja TATA	-88 a -85 -133 a -129 -137 a -134, -630 a -626	-119 a -116	-121 a -117 -230 a -227	-151 a -148 -297 a -294 -474 a -471
Caja CAAT	-118 a -115 -306 a -303 -568 a -565	-334 a -331 -545 a -541 -620 a -617	-63 a -60 -132 a -129	-359 a -356 -571 a -567
Secuencia señal de poliadenilación AATAAA			+352 a +355	

El análisis de las regiones promotoras mediante el programa MatInspector (Cartharius *et al.*, 2005) permitió la identificación de posibles secuencias señal de unión a factores de transcripción. Entre las secuencias más importantes se han identificado aquellas relacionadas con la activación de genes inducidos por nitrógeno. Estas secuencias podrían estar implicadas en la activación de los genes *FHG* en procesos relacionados con el metabolismo del nitrógeno. Igualmente se detectan secuencias señal de unión a factores

de transcripción relacionados con la respuesta a situaciones de estrés. Asimismo, muestran secuencias señal de unión a factores de transcripción que inducen la activación de genes de regulación de la fase G1 del ciclo celular. Las secuencias indicadas, y sus localizaciones en las regiones promotoras correspondientes, se muestran en las Tablas 11, 12, 13 y 14.

Tabla 11. Predicción de factores de transcripción que pueden unirse a la región promotora del gen *FHG1*. En la primera columna se indica el nombre de la familia de factores de transcripción que reconocen la secuencia señal consenso. En la segunda y tercera columna se muestra el inicio y fin de la secuencia. En la cuarta columna se muestra la orientación de la cadena en la que se localiza la secuencia. En la quinta columna se indica la ratio de semejanza de la secuencia detectada con la secuencia consenso señal. En la última columna se indica la secuencia consenso.

Familia	Inicio	Fin	Cadena	Ratio	Secuencia
Asparagine-rich zinc finger 1	608	616	+	0,97	aAAAAgaag
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	42	48	+	0,994	TATCaat
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	185	191	+	0,987	TATCttc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	518	524	-	0,961	TATCccc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	686	692	+	0,994	TATCaag
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	900	906	+	0,994	TATCaac
Calcineurin-dependent transcription factor	162	168	-	0,95	gcGGCTg
Fungal basic leucine zipper family	229	249	+	0,974	caqccactcttGTCAcagq
Fungal GATA binding factors	35	49	-	0,981	gattGATAagcacca
Fungal TALE homeodomain class	8	20	+	0,984	tccagctGTCAag
Fungal TALE homeodomain class	383	395	+	0,956	attgactGTCAga
G1 specific transcription factors	7	15	+	0,962	atcCAGCtg
G1 specific transcription factors	617	625	+	0,964	ctcCAGCgc
Pseudo hyphal determinant 1	636	648	+	0,953	gacGTGCcgctca
RNA polymerase II transcription factor II B	813	819	+	1	ccqCGCC
Yeast heat shock factors	528	560	-	0,955	tcgatccagactgatGGAAtcagggcccaa
Yeast mating factors	470	482	-	0,971	cttccTGTAadt
Yeast Mlu I cell cycle box	59	71	-	0,95	accqcaCGAAtca
Yeast stress response elements	78	92	-	1	actcacaGGGGacag

Tabla 12. Predicción de factores de transcripción que pueden unirse a la región promotora del gen *FHG2*. En la primera columna se indica el nombre de la familia de factores de transcripción que reconocen la secuencia señal consenso. En la segunda y tercera columna se muestra el inicio y fin de la secuencia. En la cuarta columna se muestra la orientación de la cadena en la que se localiza la secuencia. En la quinta columna se indica la ratio de semejanza de la secuencia detectada con la secuencia consenso señal. En la última columna se indica la secuencia consenso.

Familia	Inicio	Fin	Cadena	Ratio	Secuencia
Asparagine-rich zinc finger 1	664	668	+	0,97	aAAAAgaag
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	98	101	+	0,994	TATCaat
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	241	244	+	0,987	TATCttc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	574	577	-	0,961	TATCccc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	742	745	+	0,994	TATCaag
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	956	959	+	0,994	TATCaac
Calcineurin-dependent transcription factor	218	221	-	0,95	gcGGCTg
Fungal basic leucine zipper family	39	49	-	0,978	gattgagataaCACGtagagct
Fungal GATA binding factors	91	98	-	0,981	gattGATAagcacca
G1 specific transcription factors	63	67	+	0,962	atcCAGCtg
Pseudo hyphal determinant 1	90	96	+	0,968	atcGTGCttatca
RNA polymerase II transcription factor II B	869	872	+	1	ccqCGCC
Yeast activator of glycolytic genes	26	34	-	0,966	acCTTCctcaatttgt
Yeast heat shock factors	584	600	-	0,955	tcgatccagactgatGGAAtcagggcccaa
Yeast mating factors	526	532	-	0,971	cttccTGTAadt
Yeast middle sporulation elements	20	27	+	0,968	agqagaCACAAattg
Yeast Mlu I cell cycle box	115	121	-	0,95	accqcaCGAAtca

Tabla 13. Predicción de factores de transcripción que pueden unirse a la región promotora del gen *FHG3*. En la primera columna se indica el nombre de la familia de factores de transcripción que reconocen la secuencia señal consenso. En la segunda y tercera columna se muestra el inicio y fin de la secuencia. En la cuarta columna se muestra la orientación de la cadena en la que se localiza la secuencia. En la quinta columna se indica la ratio de semejanza de la secuencia detectada con la secuencia consenso señal. En la última columna se indica la secuencia consenso.

Familia	Inicio	Fin	Cadena	Ratio	Secuencia
Asparagine-rich zinc finger 1	586	594	-	0,97	qAAAAgaaa
Asparagine-rich zinc finger 1	591	599	-	1	aAAAAgaaa
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	127	133	-	0,961	TATCagt
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	173	179	+	0,994	TATCaag
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	437	443	+	0,974	TATCcta
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	505	511	-	1	TATCtaa
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	519	525	+	0,981	TATCqcc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	636	642	+	0,987	TATCacc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	670	676	-	0,987	TATCaca
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	675	681	+	0,994	TATCtca
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	683	689	+	0,968	TATCcat
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	749	755	-	0,955	TATCctc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	759	765	+	0,968	TATCtgg
Calcineurin-dependent transcription factor	234	240	-	0,967	gaGGCTg
Fungal basic leucine zipper family	177	197	-	0,987	atctctctttaGTCAactt
G1 specific transcription factors	78	86	-	0,971	gacCAGCtt
G1 specific transcription factors	425	433	+	0,975	tccCAGCtg
Homeodomain-containing transcriptional regulators	128	142	+	0,982	ctgataATTAccatc
Iron-responsive transcriptional activators	505	519	+	0,982	ttagataCACCctct
Iron-responsive transcriptional activators	628	642	-	0,978	ggtgataCACCcaca
M-box interacting with Mat1-Mc	414	424	-	0,975	tccATTGttaq
pH responsive regulators	274	290	+	0,985	cataGCCAagacttccc
Transcriptional regulator of methionine metabolism	138	152	-	0,989	gacgtGTGGcgaatg
Yeast activator of glycolytic genes / repressor of mating type	625	647	-	0,981	gacggggtgataCACcacaac
Yeast activator of glycolytic genes	311	327	-	1	gcCTTCcactaaagaa
Yeast heat shock factors	421	453	-	0,954	caagaaatctacgataGAACagctggatcca
Yeast mating factors	871	883	-	0,971	acttctGTAAact
Yeast metabolic regulator	375	383	+	0,982	gaCCCCact
Yeast stress response elements	521	535	+	0,97	tcacctaGGGGtat

Tabla 14. Predicción de factores de transcripción que pueden unirse a la región promotora del gen *FHG4*. En la primera columna se indica el nombre de la familia de factores de transcripción que reconocen la secuencia señal consenso. En la segunda y tercera columna se muestra el inicio y fin de la secuencia. En la cuarta columna se muestra la orientación de la cadena en la que se localiza la secuencia. En la quinta columna se indica la ratio de semejanza de la secuencia detectada con la secuencia consenso señal. En la última columna se indica la secuencia consenso.

Familia	Inicio	Fin	Cadena	Ratio	Secuencia
Asparagine-rich zinc finger 1	6	14	+	0,97	qAAAAgaaa
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	21	27	-	0,987	TATCttt
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	84	90	-	0,961	TATCcct
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	91	97	-	0,961	TATCcca
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	105	111	+	0,981	TATCqcc
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	337	343	+	0,955	TATCqga
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	368	374	+	0,961	TATCaga
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	407	413	+	0,955	TATCctg
Asperg./Neurospora-activ. of genes induced by nitrogen	533	539	+	0,987	TATCqaa
Fungal basic leucine zipper family	637	657	-	1	attatagccttaGTAAcata
Fungal basic leucine zipper family	772	792	+	0,961	tatgtgaaataatgTAATcaa
G1 specific transcription factors	753	761	-	1	gacCAGCaq
Monomeric Gal4-class motifs	705	721	-	0,979	taccTCGGcaagaaacc
Pseudo hyphal determinant 1	190	202	-	0,955	aaqcTGGGtatgg
Pseudo hyphal determinant 1	895	907	-	0,957	aacGTGCgaagac
Regulatory factor X protein, homologous to mammalian RFX	966	980	+	0,96	tagccattGCAAccg
Yeast activator of glycolytic genes	787	803	-	0,962	gcCTTCcttcttatt
Yeast GCN4 factor	241	253	+	0,956	ctttgaGTCAgat
Yeast mating factors	287	299	-	0,956	tatcATGTcact

3.3 Análisis de las proteínas deducidas codificadas por los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4*.

3.3.1 Dominios funcionales de las proteínas FHG

Las secuencias de aminoácidos deducidas codificadas por los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4* tienen un tamaño de 422, 416, 456 y 430 aminoácidos, respectivamente. En la Tabla 15 se presenta la información sobre la composición aminoacídica de cada una de las cuatro proteínas.

Tabla 15. Composición aminoacídica de las proteínas codificadas por los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* Y *FHG4*.

Gen FHG1				Gen FHG2			
Aminoácidos	Código	Número	%	Aminoácidos	Código	Número	%
Ala	A	36	8.6	Ala	A	42	10.1
Gly	G	28	6.7	Gly	G	29	7.0
Met	M	9	2.1	Met	M	4	1.0
Ser	S	29	6.9	Ser	S	26	6.3
Cys	C	2	0.5	Cys	C	2	0.5
His	H	12	2.9	His	H	13	3.1
Asn	N	16	3.8	Asn	N	13	3.1
Thr	T	23	5.5	Thr	T	23	5.5
Asp	D	23	5.5	Asp	D	21	5.1
Ile	I	27	6.4	Ile	I	25	6.0
Pro	P	18	4.3	Pro	P	23	5.5
Val	V	24	5.7	Val	V	25	6.0
Glu	E	31	7.4	Glu	E	31	7.5
Lys	K	25	5.9	Lys	K	26	6.3
Gln	Q	22	5.2	Gln	Q	19	4.6
Trp	W	7	1.7	Trp	W	5	1.2
Fhe	F	15	3.6	Fhe	F	14	3.4
Leu	L	41	9.7	Leu	L	45	10.4
Arg	R	17	4.0	Arg	R	14	3.4
Tyr	Y	16	3.8	Tyr	Y	15	3.6

Gen FHG3				Gen FHG4			
Aminoácidos	Código	Número	%	Aminoácidos	Código	Número	%
Ala	A	31	6.8	Ala	A	37	8.6
Gly	C	6	1.3	Gly	G	30	7.0
Met	D	26	5.7	Met	M	11	2.6
Ser	E	27	5.9	Ser	S	25	5.8
Cys	F	17	3.7	Cys	C	2	0.5
His	G	27	5.9	His	H	15	3.5
Asn	H	13	2.9	Asn	N	14	3.3
Thr	I	27	5.9	Thr	T	18	4.2
Asp	K	20	4.4	Asp	D	22	5.1
Ile	L	34	7.5	Ile	I	29	6.8
Pro	M	18	4.0	Pro	P	25	5.8
Val	N	18	4.0	Val	V	35	8.2
Glu	P	26	5.7	Glu	E	30	7.0
Lys	Q	16	3.5	Lys	K	25	5.8
Gln	R	33	7.3	Gln	Q	16	3.7
Trp	S	33	7.3	Trp	W	5	1.2
Fhe	T	24	5.3	Fhe	F	17	4.0
Leu	V	30	6.6	Leu	L	33	7.7
Arg	W	4	0.9	Arg	R	22	5.1
Tyr	Y	25	5.5	Tyr	Y	18	4.2

En la Figura 13, se muestra el alineamiento de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4*, las cuales muestran porcentajes de identidad al 40 %. Las proteínas *FHG1* y *FHG2* muestran el mayor porcentaje de semejanza con el 53,41 %, en tanto que el menor corresponde a *FHG1* y *FHG3*, con el 40,73 % (ver Tabla 13).

Tabla 16. Porcentaje de semejanza de las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas codificadas por los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4* de FOP-SP1.

	<i>FHG1</i>	<i>FHG2</i>	<i>FHG3</i>	<i>FHG4</i>
<i>FHG1</i>	100 %			
<i>FHG2</i>	53,41 %	100 %		
<i>FHG3</i>	40,73 %	47,30 %	100 %	
<i>FHG4</i>	43,11 %	41,37 %	40,20 %	100 %

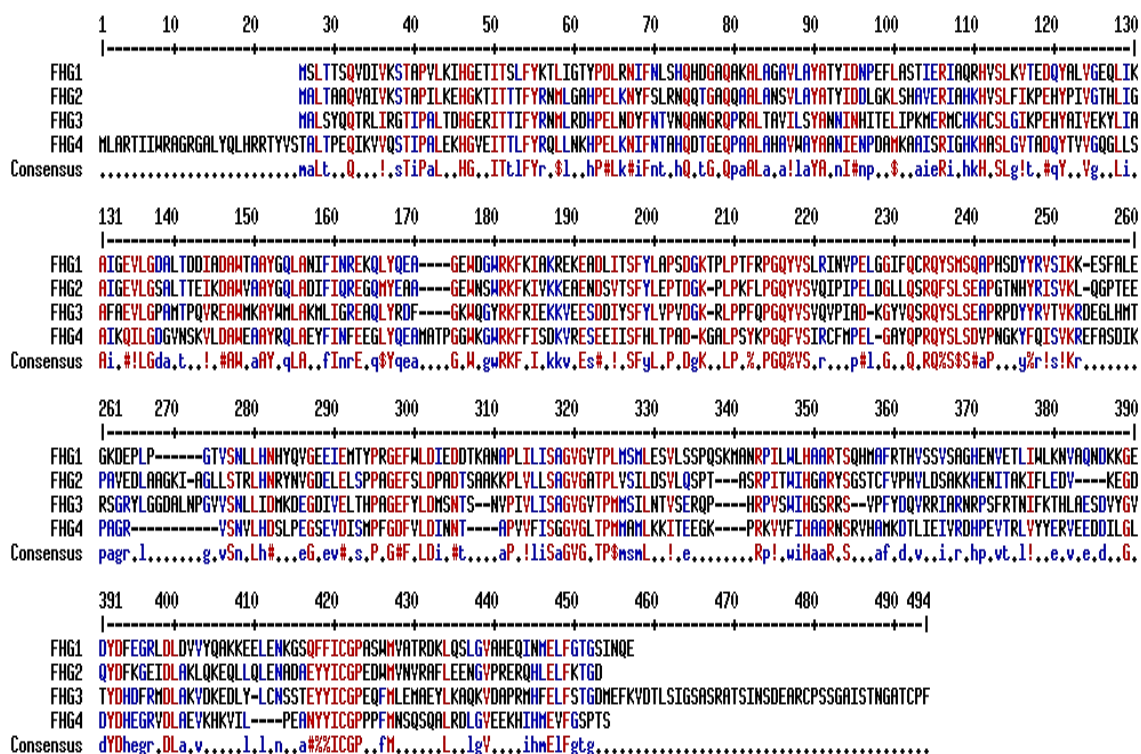


Figura 13. Alineamiento de secuencias de las proteínas tipo flavohemoglobina de FOP-SP1. El color rojo representa el 90 % de consenso y el azul más del 50 % de consenso en las secuencias de aminoácidos. Los códigos de las secuencias utilizadas corresponden a los genes codificadores de enzimas tipo flavohemoglobina de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*: *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4*.

El tamaño de las cuatro proteínas deducidas es similar. La más pequeña es la proteína FHG2, de 416 aminoácidos, y la de mayor tamaño es la proteína FHG3, de 456 aminoácidos. El estudio de los alineamientos y del grado de conservación de aminoácidos demuestra que la estructura general de las proteínas es similar en los cuatro casos (Figura 13). La proteína FHG3 tiene una extensión exclusiva de 37 aminoácidos en el extremo C-carboxilo de la proteína. Por su parte, la proteína FHG4 presenta una extensión particular en su extremo N-amino de 22 aminoácidos. Como veremos más adelante, esta extensión marca una diferencia fundamental en relación con las otras tres secuencias FHG.

El análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas permite identificar en las cuatro proteínas tres dominios funcionales bien definidos, localizados en posiciones muy similares, y con tamaños muy parecidos: un dominio globina (globin) en el extremo amino de la proteína, un dominio oxidoreductasa de unión a FAD (FAD_binding_6) en la región central y un dominio oxidoreductasa de unión a NAD (NAD_binding_1) en el extremo carboxilo. La Figura 14 muestra una representación simplificada de la organización de cada una de las cuatro proteínas analizadas y de la localización de los dominios funcionales conservados que se han identificado en cada caso.

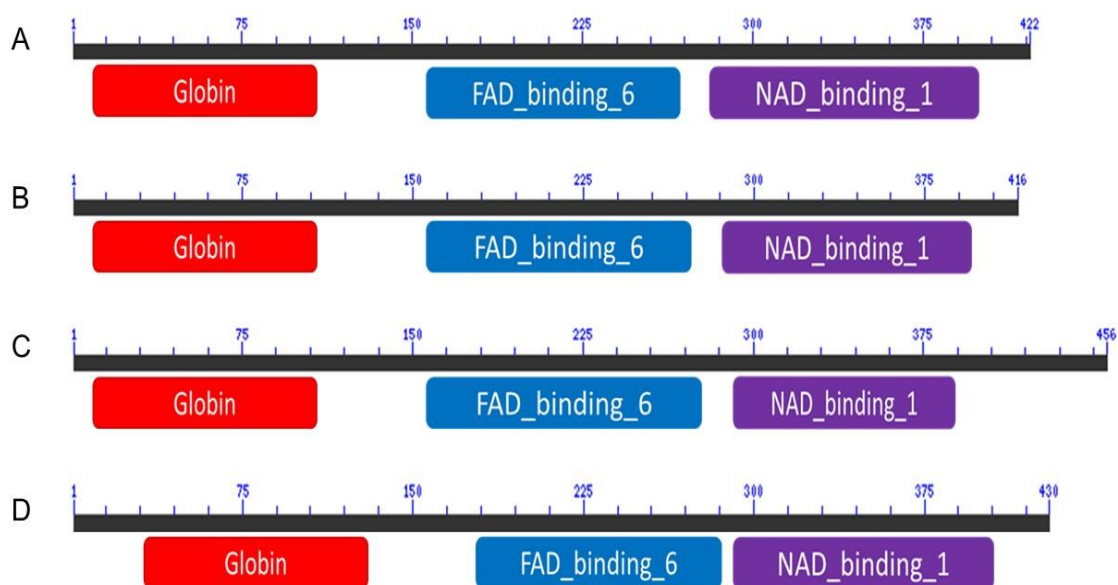


Figura 14. Dominios funcionales característicos de las proteínas de tipo flavohemoglobina, y sus posiciones relativas, identificados en las proteínas deducidas codificadas por los genes (A): *FHG1*, (B): *FHG2*, (C): *FHG3* y (D): *FHG4* de FOP-SP1.

En la Tabla 17 se resume la información relacionada con la posición de cada uno de los tres dominios funcionales identificados en la proteína correspondiente y el valor E que el análisis bioinformático asigna en cada caso.

Tabla 17. Dominios funcionales presentes en las proteínas FHG1, FHG2, FHG3 y FHG4.

Gen	Inicio	Fin	E-Value	Dominios
<i>FHG1</i>	7	104	8,7051e-07	Globin
	153	263	0,000221694	FAD_binding_6
	279	396	4,98703e-10	NAD_binding_1
<i>FHG2</i>	7	104	1,42061e-08	Globin
	153	269	2,65117e-05	FAD_binding_6
	283	385	1,53381e-09	NAD_binding_1
<i>FHG3</i>	10	101	0,00250719	Globin
	153	270	2,73308e-07	FAD_binding_6
	282	387	1,3732e-08	NAD_binding_1
<i>FHG4</i>	32	129	2,45399e-10	Globin
	182	288	8,79661e-10	FAD_binding_6
	298	407	8,17601e-20	NAD_binding_1

El programa CCD del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015) permite visualizar en forma de alineamientos locales las semejanzas entre los dominios funcionales recogidos en la base de datos y los posibles dominios funcionales presentes en las secuencias de aminoácidos objeto de análisis en cada caso. Las Figuras 15, 16 y 17 muestran los alineamientos obtenidos en el análisis llevado a cabo con la proteína FHG1. Los resultados obtenidos en los análisis de FHG2, FHG3 y FHG4 son análogos y no se muestran.

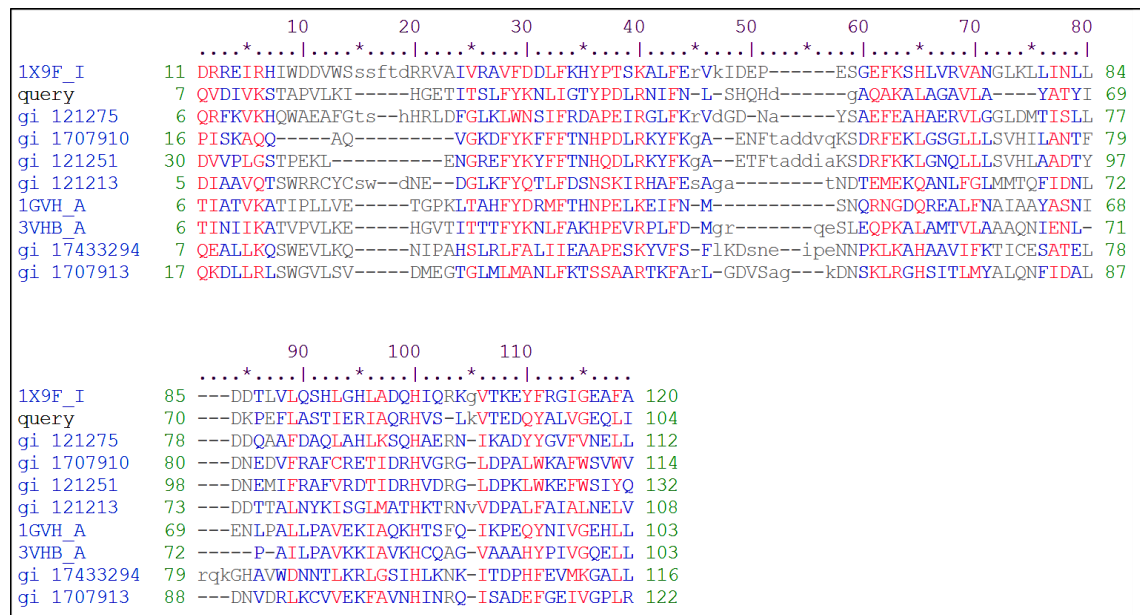


Figura 15. Dominios globina identificados en proteínas representativas con el programa CCD semejantes al dominio globina presente en la proteína codificada por el gen *FHG1*. Los códigos de cada secuencia corresponden a los siguientes organismos: 1X9F_I *Lumbricus terrestris*; query: *FHG1*; gi 121275 *Tubifex tubifex*; gi1707910 *Nippostrongylus brasiliensis*; gi 121251 *Trichostrongylus colubriformis*; gi 121213 *Calyptogena soyocae*; GVH_A *Escherichia coli*; 3VHB_A *Vitreoscilla stercoraria*; gi 17433294 *Casuarina glauca*; gi 1707913 *Anadara trapezia*.

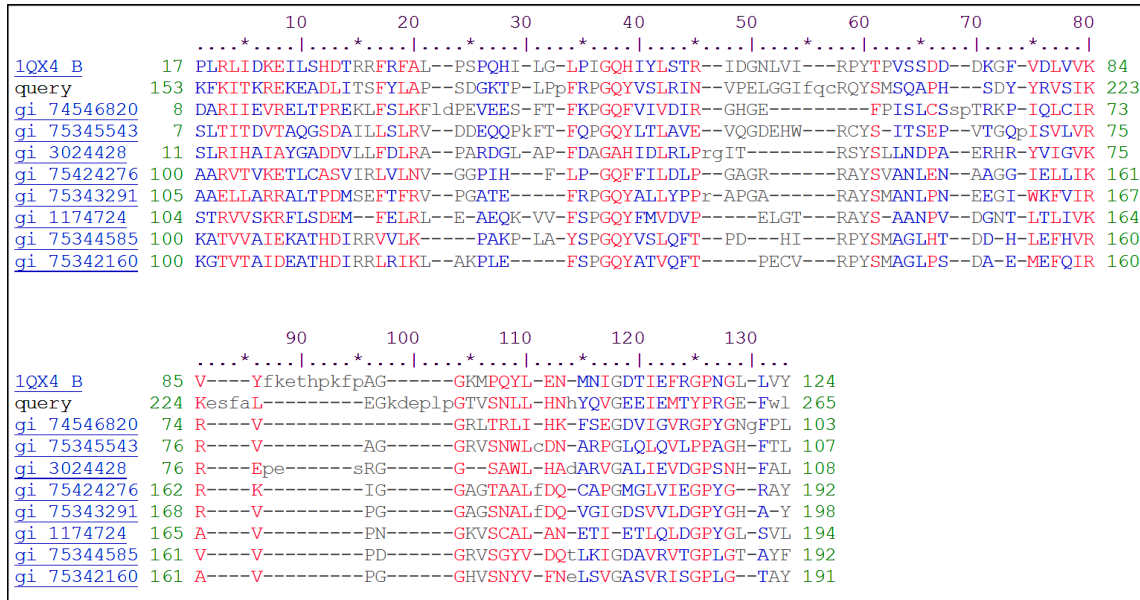


Figura 16. Dominios oxidoreductasa FAD (FAD_binding_6) identificados en proteínas representativas con el programa CCD semejantes al dominio oxidoreductasa FAD (FAD_binding_6) presente en la proteína codificada por el gen *FHG1*. Los códigos de cada secuencia corresponden a los siguientes organismos. 1QX4_B *Rattus norvegicus*; query-FHG1; gi 74546820 *Pyrococcus abyssi*; gi 75345543 *Pseudomonas putida*; gi 3024428 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; gi75424276 *Xanthobacter autotrophicus* Py2; gi75343291 *Cupriavidus necator*; gi 1174724 *Pseudomonas mendocina*; gi 75344585 *Pseudomonas aeruginosa*; gi75342160 *Ralstonia* sp.



Figura 17. Dominio oxidoreductasa NAD (NAD_binding_1) identificados en proteínas representativas con el programa CCD semejantes al dominio oxidoreductasa NAD (NAD_binding_1) presente en la proteína codificada por el gen *FHG1*. Los códigos de cada secuencia corresponden a los siguientes organismos. 2XNJ_B *Escherichia Coli*; query- *FHG1*; gi 122065674 *Ustilago maydis*; 30ZV_A *Ralstonia eutropha* H16; 1GVH_A *Escherichia coli*; gi 1174724 *Pseudomonas mendocina*; gi 1174855 *Aliivibrio fischeri*; gi 1174854 *Photorhabdus luminescens*; gi 548358 *Neurospora crassa* OR74A; gi 128189 *Hordeum vulgare*.

3.3.2 Localización subcelular de las proteínas FHG

Las secuencias de las cuatro proteínas FHG fueron analizadas utilizando herramientas bioinformáticas desarrolladas para predecir la localización subcelular de proteínas. En primer lugar se evaluó la localización subcelular de las proteínas FHG de FOP utilizando el programade predicción MultiLoc2 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>).

Tabla 18. Valores de probabilidad de localización subcelular de las proteínas FHG estimados con el programa de predicción MultiLoc2.

Proteína	Prob. Loc. Citoplasma	Prob. Loc. Nuclear	Prob. Loc. Mitocondria	Prob. Loc. Peroxisoma	Prob. Loc. extracelular	Prob. Loc. R.E.	Prob. Loc. vacuolar	Prob. Loc. A.R. Golgi
FHG1	0.82	0.09	0.03	0.04	0.0	0.0	0.0	0.0
FHG2	0.95	0.01	0.02	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0
FHG3	0.82	0.04	0.1	0.04	0.0	0.0	0.0	0.0
FHG4	0.15	0.01	0.79	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0

La Tabla 18 muestra que las proteínas FHG1, FHG2 y FHG3 muestran valores de probabilidad de localización citoplasmática elevados (superior a 0,8 en los tres casos). Por su parte, la proteína FHG4 presenta un valor de probabilidad de localización mitocondrial muy alto, de 0,79.

Para confirmar la predicción de localización mitocondrial de la proteína FHG4 se analizaron las cuatro secuencias FHG con otros dos programas de predicción. La Tabla 19 muestra los valores de probabilidad de localización mitocondrial obtenidos. En primer lugar, el análisis llevado cabo con TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) permite proponer que la proteína FHG4 se localiza en la mitocondria, ya que el valor de probabilidad de localización mitocondrial es muy alto (0,909). Para las otras tres proteínas FHG los valores de probabilidad correspondientes son muy bajos. Por su parte, el programa MITOFATES (<http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/>) confirma la posible localización subcelular de FHG4, ya que calcula un valor de probabilidad de 0,980 para la presencia de una presecuencia mitocondrial en el extremo amino de esta proteína, en la región correspondiente a la extensión específica característica de esta proteína FHG y ausente en las otras tres proteínas analizadas. MITOFATES identifica, además, un sitio de corte de la proteína peptidasa mitocondrial en la posición 22 de la secuencia.

Tabla 19. Valores de probabilidad de localización mitocondrial, estimados con el programa de predicción TargetP, y de presencia de una presecuencia mitocondrial, estimados con el programa MITOFATES, de las proteínas FHG de FOP.

Proteína	Probabilidad de localización mitocondrial (TargetP)	Probabilidad de presecuencia mitocondrial (MITOFATES)
FHG1	0,103	0,000
FHG2	0,135	0,068
FHG3	0,431	0,181
FHG4	0,909	0,980

Todo ello permite proponer que las proteínas FHG1, FHG2 y FHG3 son proteínas citoplasmáticas mientras que la proteína FHG4 es una proteína de localización mitocondrial.

3.4 Análisis filogenético de los genes codificadores de flavohemoglobinas.

Los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4* muestran un elevado nivel de semejanza con genes ortólogos identificados en procariotas, eucariotas y protozoarios y las proteínas codificadas presentan los tres dominios funcionales característicos de las proteínas de tipo flavohemoglobina identificadas en otros organismos.

Utilizando las secuencias depositadas en bases de datos públicas, de 61 proteínas de tipo flavohemoglobina de hongos, bacterias y protozoarios se construyó un árbol filogenético con el programa Fasttree (<http://www.microbesonline.org/fasttree/>) e inferido con el método Neighbor-Joining empleando el modelo Jones-Taylor Thorton (JTT), con un bootstrap de 1000 repeticiones para calcular la fiabilidad del árbol (Figura 18). El árbol filogenético se resuelve en cuatro clados monofiléticos, que ubica a las proteínas codificadas por los genes *FHG1*, *FHG2* y *FHG3* en el clado 2, que a su vez se subdivide en 4 subclados. Cada una de las proteínas se ubica en un subclado diferente junto a proteínas de especies pertenecientes al mismo género, como *F. verticillioides* y *F. graminearum*.

La proteína *FHG1* (*Fusarium oxysporum* 1) se posiciona en el subclado 4 junto a las proteínas de *F. verticillioides* y *Verticillum dhaliae*, mostrando con ellas un porcentaje de identidad del 92,39 % y 54,39 %, respectivamente. La proteína *FHG2* (*Fusarium oxysporum* 2) se posiciona en el subclado 3 junto a las proteínas de *Nectria haematococca*, *F. graminearum* y *F. verticillioides*, mostrando con ellas unos porcentaje de identidad del 86,23 %, 92,27 % y 98,79 %, respectivamente. La proteína *FHG3* (*Fusarium oxysporum* 3) se posiciona en el subclado 1 junto a las correspondientes proteínas de *Trichoderma reesei*, *Chaetomium globosum*, *Neurospora crassa*, *Podospora anserina*, *F. graminearum* y *F. verticillioides*, con las que presenta unos porcentajes de identidad de 41,87 %, 54,61 %, 61,20 %, 67,47 %, 92,95 % y 97,79 %, respectivamente.

El clado 3 se subdivide en tres subclados. La proteína *FHG4* (*Fusarium oxysporum* 4) se encuentra ubicada en el subclado 2 junto a las proteínas de *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae* y *A. terreus* y con las que muestra una identidad del 62,94%, 64,32 %, 67,37 % y 68,9 %, respectivamente. En este mismo clado se encuentran las proteínas codificadas por los genes ortólogos de *Chromobacterium violaceum*, *Borella avium*, *Burkholderia graminis*, *Sinorhizobium meliloti* y *Echerichia coli* y *Salmonella enterica*, con las que está relacionada pero de forma más distante (Figura 18).

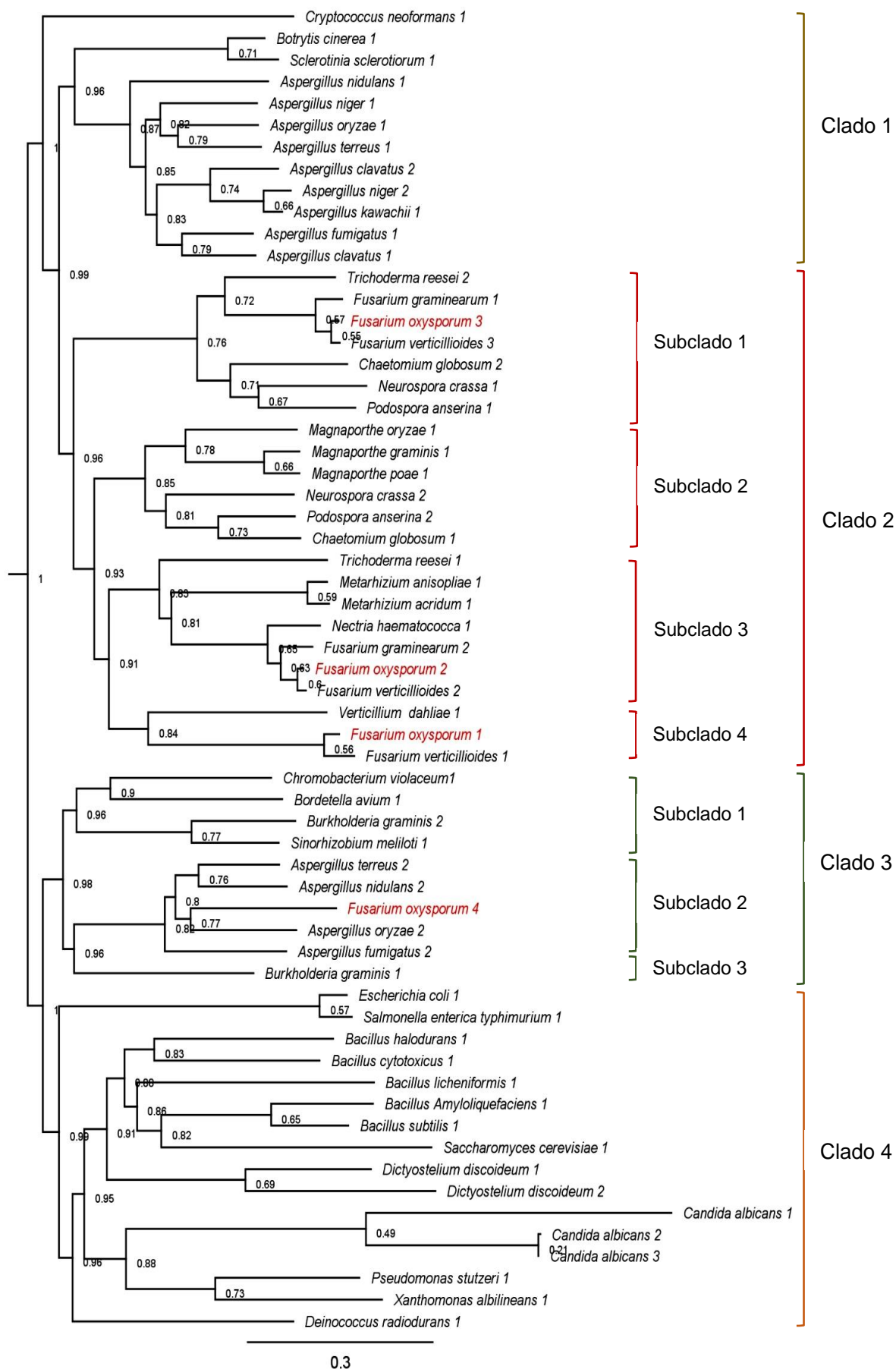


Figura 18. Árbol filogenético de las proteínas de tipo flavohemoglobina.

Los números en los nodos indican el valor de bootstrap que proporciona la fiabilidad de la intersección. La longitud de la ramas indica la distancia filogenética. Números de acceso de las secuencias de proteínas utilizadas: AAP41066 *Cryptococcus neoformans* 1, CAP74387 *Botrytis cinerea* 1, XP_001588433 *Sclerotinia sclerotiorum* 1, XP_664773 *Aspergillus nidulans* 1, Afug03410 *Aspergillus fumigatus* 1, XP_001274889 *Aspergillus clavatus* 1, CAF25490 *Aspergillus niger* 2, GAA83221 *Aspergillus kawachii* 1, AO090011000202 *Aspergillus oryzae* 1, XP_001211325 *Aspergillus terreus* 1, XP_001400872 *Aspergillus niger* 1, XP_001912543 *Podospora anserina* 1, XP_001220963 *Chaetomium globosum* 2, XP_963988 *Neurospora crassa* 1, EGR49938 *Trichoderma reesei* 2, FGSG_00765 *Fusarium graminearum* 1, FHG3 *Fusarium oxysporum* 3, FVG_14660 *Fusarium verticillioides* 3, MGG_00198 *Magnaporthe oryzae* 1, GGTG_02162 *Magnaporthe graminis* 1, MAPG_06211 *Magnaporthe poae* 1, XP_957939 *Neurospora crassa* 2, XP_001904160 *Podospora anserina* 2, XP_001228021 *Chaetomium globosum* 1, XP_003048388 *Nectria haematococca* 1, FGSG_04458 *Fusarium graminearum* 2, FHG2 *Fusarium oxysporum* 2, FVEG_11186 *Fusarium verticillioides* 2, EGR46261 *Trichoderma reesei* 1, EFZ03946 *Metarhizium anisopliae* 1, EFY87064 *Metarhizium acridum* 1, VDAG_10220 *Verticillium dahliae* 1, FHG1 *Fusarium oxysporum* 1, FVEG_13827 *Fusarium verticillioides* 1, NP_903158 *Chromobacterium violaceum* 1, YP_786548 *Bordetella avium* 1, ZP_02884306 *Burkholderia graminis* 2, AAP93662 *Sinorhizobium meliloti* 1, XP_001216520 *Aspergillus terreus* 2, Afug06080 *Aspergillus fumigatus* 2, XP_661126 *Aspergillus nidulans* 2, FHG4 *Fusarium oxysporum* 4, AO090012000171 *Aspergillus oryzae* 2, ZP_02882530 *Burkholderia graminis* 1, AEJ57821 *Escherichia coli* 1, AAC24484 *Salmonella enterica typhimurium* 1, NP_241924 *Bacillus halodurans* 1, YP_001374491 *Bacillus cytotoxicus* 1, YP_003921355 *Bacillus amyloliquefaciens* 1, ADM37384 *Bacillus subtilis* 1, BAA83810 *Dictyostelium discoideum* 1, BAA83811 *Dictyostelium discoideum* 2, EDN61819 *Saccharomyces cerevisiae* 1, YP_078209 *Bacillus licheniformis* 1, XP_719397 *Candida albicans* 1, XP_711060 *Candida albicans* 2, XP_711046 *Candida albicans* 3, CAD55817 *Pseudomonas stutzeri* 1, YP_003376358 *Xanthomonas albilineans* 1, NP_285566 *Deinococcus radiodurans* 1.

3.5 Análisis de expresión de los genes *FHG*

Una vez identificada la presencia de los cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina, *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4*, en las estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, nos propusimos determinar la naturaleza de las funciones fisiológicas en las que la detoxificación del NO pueda jugar un papel relevante en este hongo. Consideramos sus posibles funciones tanto durante el crecimiento saprofítico del hongo como durante la interacción del mismo con su huésped. Como una primera fuente de información sobre la función de cada uno de los cuatro genes *FHG* decidimos llevar a cabo un análisis de expresión detallado de los mismos.

3.5.1 Condiciones para el análisis durante el crecimiento saprofítico y en respuesta a NO.

Las enzimas de tipo flavohemoglobina constituyen uno de los mecanismos de detoxificación de NO más importantes, si no el principal, en los microorganismos, y la expresión de los genes codificadores de flavohemoglobinas en distintos sistemas es inducida por exposición a NO exógeno. Se ha comprobado, por otra parte, que el NO juega un papel relevante en procesos de diferenciación y desarrollo, en particular en la germinación de las esporas en hongos. Por estas razones decidimos evaluar y cuantificar inicialmente la expresión de los genes *FHG* durante el desarrollo y la germinación en *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* durante el ciclo de vida saprofítico. Para lo cual es necesario determinar previamente las condiciones experimentales más apropiadas para llevar a cabo esta cuantificación.

Decidimos estudiar dos estirpes diferentes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*: una estirpe muy virulenta, la estirpe FOP-SP1, y una estirpe poco virulenta, la estirpe FOP-SP4, y en ambos casos se evaluaría la eficiencia y la cinética de la germinación de los microconidios en medio de cultivo líquido. Después de tener en cuenta distintas variables y consideraciones y de evaluar algunos experimentos preliminares decidimos utilizar de forma rutinaria las siguientes condiciones experimentales:

1. Como medio de cultivo base se utilizó el medio de cultivo mínimo líquido suplementado con glucosa 1 % como fuente de carbono (MMG) (ver sección 2.2.2.2 de Materiales y Métodos).

2. Para comprobar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la eficiencia de germinación los medios fueron suplementados en su caso con 10 mM de tartrato de amonio o 10 mM de nitrato de sodio.
3. Para evaluar el efecto del NO se añadió al medio de cultivo (desde el inicio de la incubación) 500 μ M de nitroprusiato sódico (SNP) como donador de NO.
4. Los efectos de la fuente de nitrógeno y del donador de NO fueron estimados cuantificando el porcentaje de esporas germinadas a distintos tiempos desde el inicio del cultivo: 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas.

Se llevaron a cabo tres réplicas biológicas de un experimento de evaluación de germinación de microconidios de las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4 en las condiciones indicadas. Las Figuras 19 y 20 presentan los resultados obtenidos.

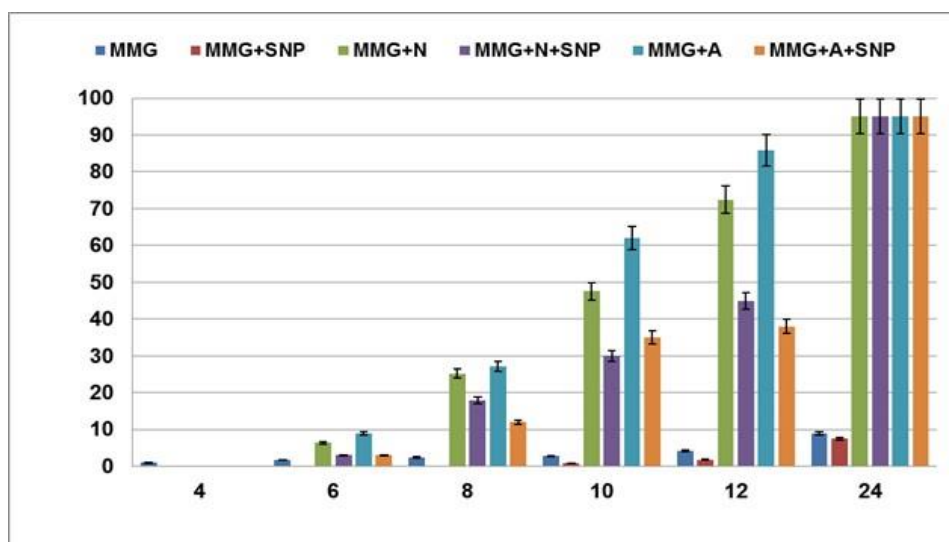


Figura 19. Germinación de microconidios de FOP-SP1 en medio mínimo con 1 % de glucosa (MMG) y MMG suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) o 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A). En los tres casos los cultivos se realizaron en ausencia y en presencia de 500 μ M de SNP. La evaluación de la germinación se realizó a los tiempos indicados (h). Los histogramas representan los valores medios de tres experimentos y sus desviaciones estándar.

En general la germinación en ambas cepas es similar en las condiciones de cultivo evaluadas. En cada caso se observa que es indispensable la presencia de una fuente de nitrógeno para que se active el programa de germinación, y que en ausencia de nitrógeno el programa de germinación no se inicia o el resultado es mínimo. En los medios suplementados bien con amonio o con nitrato en ausencia de NO exógeno la germinación se produce de forma progresiva, iniciándose a las 6 horas. A las 10 horas en medios con nitrato un 47,54 % de los microconidios en el caso de la cepa FOP-SP1 y un 40,18 % de

los microconidios en el caso de FOP-SP4 han germinado. En medios suplementados con amonio entre estos porcentajes son del 61,94 % y 61,82 %, respectivamente. La eficiencia de germinación es, por lo tanto, más alta en medios suplementados con amonio. A las 24 horas prácticamente todos los microconidios han germinado en ambas cepas y en ambos medios, formándose micelio activo en desarrollo.

Las mismas cepas (FOP-SP1 y FOP-SP4) expuestas a NO exógeno muestran un retraso significativo en la germinación de microconidios en todos los tiempos evaluados. A las 10 horas de cultivo en medio suplementado con nitrato los porcentajes de germinación son del 30 % y 16 % para FOP-SP1 y FOP-SP4, respectivamente. En medios suplementados con amonio los porcentajes son del 35 % y 26 % de los microconidios han germinado, respectivamente, mostrando mayor sensibilidad a NO exógeno la cepa silvestre FOP-SP4.

En definitiva, la adición de NO exógeno retrasa significativamente la germinación en las tres condiciones evaluadas (medios sin N y medios suplementados con amonio o nitrato). A las 24 horas todos los microconidios han germinado, probablemente porque el NO se ha degradado. No obstante, las diferencias en la longitud del tubo germinativo en las muestras tratadas con NO en relación con las muestras no tratadas con NO son evidentes. Las primeras son siempre inferiores, consecuencia del retraso en la entrada en germinación que determina la exposición a NO (datos no mostrados).

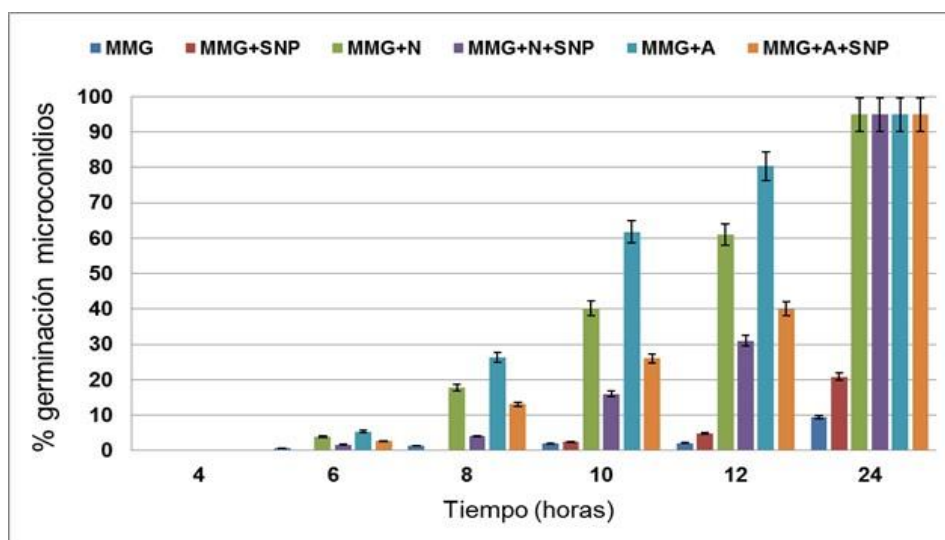


Figura 20. Germinación de microconidios de FOP-SP4 en medio mínimo suplementado con 1 % de glucosa (MMG) o en MMG suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) o 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N). En los tres casos los cultivos se realizaron en ausencia y en presencia de 500 μ M de SNP. La evaluación de la germinación se realizó a los tiempos indicados (h). Los histogramas representan los valores medios de tres experimentos y sus desviaciones estándar.

3.5.2 Análisis de expresión de los genes *FHG* durante el crecimiento saprofítico y en respuesta a NO.

Teniendo en cuenta estas observaciones decidimos llevar a cabo el análisis de expresión de los genes *FHG* en las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4 en dos momentos de desarrollo diferentes, durante la germinación de las esporas (elegimos el tiempo 9 h por corresponder a un momento en que el programa de germinación ha comenzado y la germinación es muy evidente en ausencia de NO) y las 18 h, momento en el cual las esporas han germinado y el micelio está ramificándose y creciendo activamente. Corresponden a dos estadios de desarrollo claramente diferentes sobre los que se evaluarán los niveles de expresión de los genes *FHG* en respuesta a los factores considerados. Como fuente de Nitrógeno (N) se seleccionó el tartrato de amonio porque la eficiencia de germinación en su presencia es superior en todos los tiempos considerados (Ver Figuras 19 y 20).

Los cultivos se realizaron en matraces con 50 ml de medio mínimo con 1 % glucosa (MMG), suplementado con 10 mM de tartrato de amonio con y sin exposición a NO (SNP) exógeno, inoculados con 1×10^6 microconidios/ml de las estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP-SP1) y (FOP-SP4) e incubados a 25°C con agitación constante de 120 rpm. Las muestras se recolectaron a las 9 y 18 horas en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

A partir de estas muestras se obtuvieron las preparaciones de ARN total para el análisis de expresión de los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* Y *FHG4*, tanto mediante hibridación Northern como mediante PCR a tiempo real (RT-qPCR). Para el análisis mediante Northern se prepararon filtros de nylon a los que se transfirieron 10 µg de ARN total de las muestras de interés (ver Figuras 21, 22, 23 y 24). Como control de carga se utilizó la intensidad de las bandas del ARN ribosómico 18S y 28S en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio antes de ser transferidos a las membranas. Las hibridaciones fueron llevadas a cabo en todos los casos en condiciones restrictivas. Se utilizaron como sondas de hibridación amplicones específicos de cada gen, obtenidos mediante PCR con las parejas de oligonucleótidos mostrados en la Tabla 6 y marcados con digoxigenina. Para el análisis mediante RT-qPCR se diseñaron oligonucleótidos a partir de las secuencias de las regiones codificantes de cada uno de los cuatro genes *FHG* y que permitían amplificar fragmentos específicos de cada gen (ver Tabla 6). Los datos de expresión relativa fueron normalizados en relación con la expresión del gen de expresión constitutiva *Efa1* (Factor de elongación alfa 1) y fueron referidos en cada caso al valor de expresión de cada gen en

la condición de cultivo durante 9 horas en MM suplementado con 1 % de glucosa (MMG). Asimismo se comprobó que la eficiencia de amplificación para todas las parejas de oligonucleótidos fuera superior al 95 %.

3.5.2.1 Expresión de *FHG1*

La Figura 21 presenta el análisis de expresión del gen *FHG1* en las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4. En ambas estirpes la situación observada es esencialmente la misma. Se comprueba que *FHG1* no se expresa a niveles detectables mediante Northern en ausencia de NO y que su expresión se induce a niveles elevados (detectables mediante hibridación Northern) por exposición a NO. Esta inducción sólo se produce en la fase de germinación, no en la fase de desarrollo del micelio, lo que supone que o bien el micelio es insensible a NO o bien en ese momento ya se ha degradado el NO añadido al medio de cultivo inicialmente.

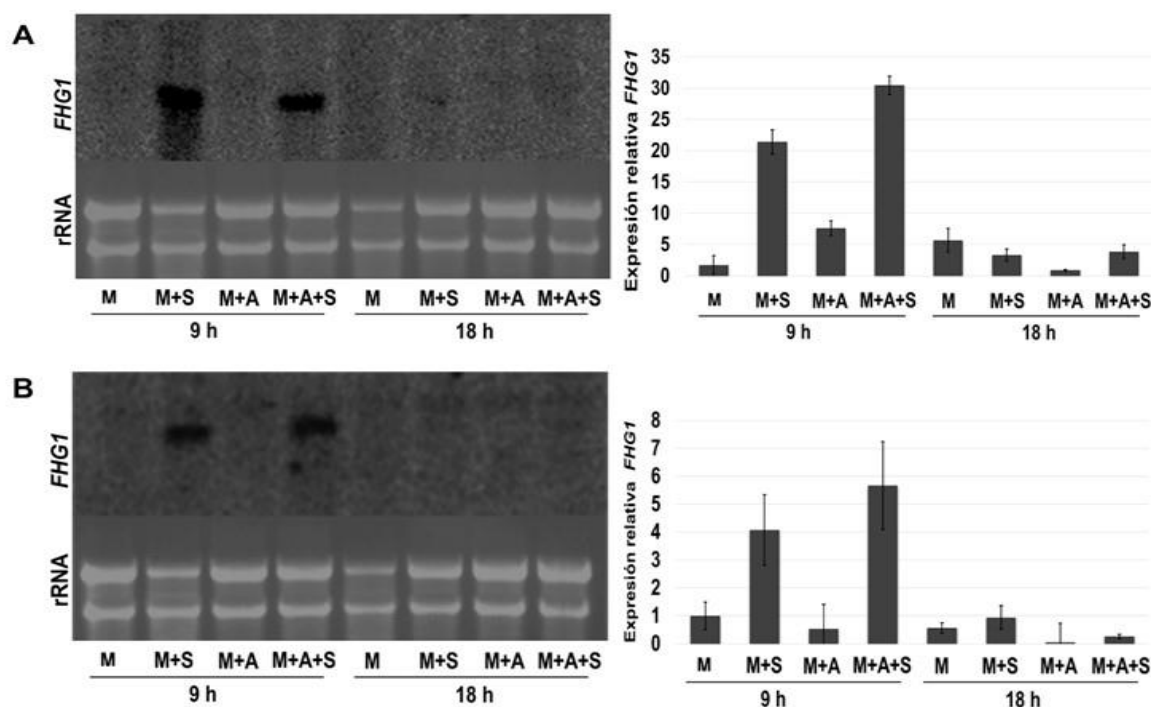


Figura 21. Análisis de expresión del gen *FHG1* de las estirpes FOP-SP1 (Panel A) y FOP-SP4 (panel B) durante el desarrollo y en condiciones de estrés nitrosativo. En cada panel la figura de la izquierda presenta los resultados de una hibridación Northern blot y el histograma de la derecha los resultados de la cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR. Las muestras de RNA utilizadas en ambos tipos de análisis corresponden a muestras derivadas de esporas cultivadas durante 9 o 18 h en medio mínimo suplementado con 1 % glucosa (M) o medio mínimo suplementado con 1 % glucosa y con 10 mM de tartrato amónico (M+A), en ausencia o en presencia de 500 μ M de SNP(+S). Los datos de RT-qPCR mostrados representan las medias de 3 experimentos (réplicas biológicas). Los datos de expresión representan los niveles de expresión relativa del gen *FHG1* normalizados en relación con el nivel de expresión del gen *Efa1* y referidos a los valores de expresión de *FHG1* a 9 horas en medio M (MMG).

El análisis de expresión mediante qPCR confirma el patrón detectado mediante hibridación Northern, permitiendo esta técnica realizar una cuantificación de los niveles de expresión del gen en relación con una condición de referencia (los valores representados muestran los valores medios de expresión en tres réplicas biológicas independientes). Se comprueba que el patrón de expresión de *FHG1* es muy parecido en ambas estirpes y que en ambos casos sólo hay un aumento importante de expresión durante la fase de germinación y en respuesta a NO exógeno. El nivel de inducción es mayor en la estirpe FOP-SP4 (aproximadamente 20X en MMG en presencia de NO y 30X en MMG+A en presencia de NO) que en la estirpe FOP-SP1 (6X y 7X, respectivamente), pero la respuesta en ambas estirpes es esencialmente la misma.

3.5.2.2 Expresión de *FHG2*

El análisis del patrón de expresión del gen *FHG2* en las condiciones indicadas se presenta en la Figura 22. También en este caso el perfil de expresión es esencialmente el mismo en ambas estirpes. El análisis comparado entre ellas mediante hibridación Northern blot resulta menos informativo en primera aproximación porque la intensidad de las bandas de hibridación detectadas en el caso de la estirpe FOP-SP1 es, en conjunto, menor, pero ciertamente el perfil de expresión en ambas estirpes es similar.

Tomando como sistema de referencia la estirpe FOP-SP4, se comprueba que la expresión de *FHG2* está regulada durante el desarrollo. Ésta es máxima en micelio cultivado durante 18 h en medio mínimo con glucosa y en ausencia de donador de NO, y resulta reprimida en presencia de amonio, condición, debemos recordar, que estimula la germinación. Es interesante destacar que en la fase de micelio, cuando éste es cultivado en medio mínimo con glucosa la exposición a NO reprime la expresión de *FHG2* (o anula la inducción observada en ausencia de NO). En presencia de amonio, condición en la que la expresión de *FHG2* es reprimida, la exposición a NO sí tiene un efecto inductor de la expresión.

Durante la fase de germinación de las esporas el perfil de expresión es diferente. Considerando los datos de cuantificación mediante RT-qPCR se comprueba que en ausencia de NO exógeno la adición de amonio al medio de cultivo también reprime la expresión de *FHG2*, aunque la magnitud de la represión es menor que en la fase de micelio en desarrollo. Sin embargo, tanto en presencia como en ausencia de amonio la adición de NO exógeno induce la expresión de *FHG2*.

Es resumen, en el caso de *FHG2* se detecta una regulación de la expresión durante el desarrollo (probablemente consecuencia de una sensibilidad diferente al NO en las dos fases consideradas, esporas en germinación y micelio) sobre la cual se superpone una regulación por fuente de nitrógeno. Ésta determina que en la fase de micelio la adición de amonio reprima la expresión de *FHG2* y que también lo haga la adición de NO en ausencia de amonio que determina que la adición de amonio reprima la expresión de *FHG2* y que la exposición a NO en presencia de amonio aumente la expresión de *FHG2*. Sólo en el caso de la fase de desarrollo de micelio y en ausencia de amonio la exposición a NO no determina un aumento de la expresión de *FHG2*.

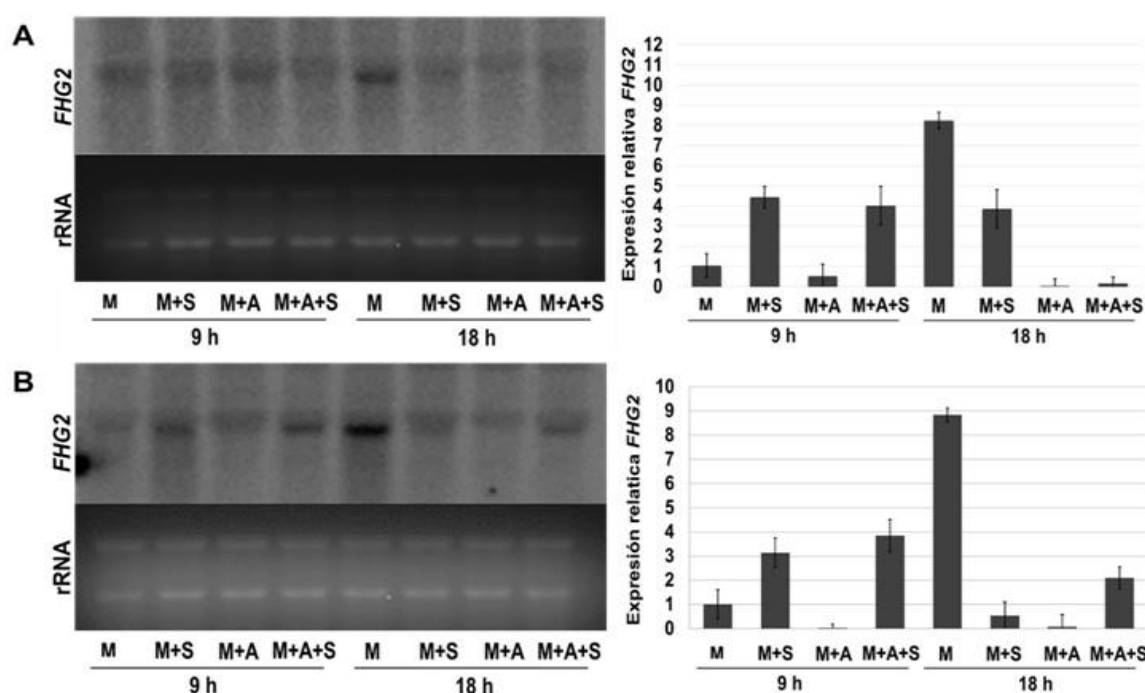


Figura 22. Análisis de expresión del gen *FHG2* de las estirpes FOP-SP1 (Panel A) y FOP-SP4 (panel B) durante el desarrollo y en condiciones de estrés nitrosativo. En cada panel la figura de la izquierda presenta los resultados de una hibridación Northern blot y el histograma de la derecha los resultados de la cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR. Las muestras de RNA utilizadas en ambos tipos de análisis corresponden a muestras derivadas de esporas cultivadas durante 9 o 18 h en medio mínimo suplementado con 1 % glucosa (M) o medio mínimo suplementado con 1 % glucosa y con 10 mM de tartrato amónico (M+A), en ausencia o en presencia de 500 μ M de SNP (+S). Los datos de RT-qPCR mostrados representan las medias de 3 experimentos (réplicas biológicas). Los datos de expresión representan los niveles de expresión relativa del gen *FHG2* normalizados en relación con el nivel de expresión del gen *Efa1* y referidos a los valores de expresión de *FHG2* a 9 horas en medio M (MMG).

3.5.2.3 Expresión de *FHG3*

Los patrones de expresión de *FHG3* en las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4 se presentan en la Figura 23. Los patrones de expresión en ambas estirpes son similares. Aunque es posible considerar algunas diferencias en la magnitud de los valores de expresión

(inducción) entre ambas cepas, el comportamiento general que muestran una y otra en las condiciones analizadas es similar. En este caso las esporas en germinación y el micelio en desarrollo responden de forma similar, en particular en la estirpe FOP-SP1, lo que supone que no existe una regulación obvia por desarrollo. Sí se observa una regulación por amonio, cuya presencia estimula la expresión de *FHG3*, de forma más intensa en la fase de esporas en germinación, y no resulta obvia, en general, una regulación por exposición a NO. Sólo se observa una diferencia importante en el comportamiento de las dos cepas, y es en la fase de micelio en la estirpe FOP-SP4, que parece responder de manera más intensa a la exposición a NO en presencia de amonio. No obstante, es necesario tener en cuenta que en esta condición lo que parece producirse es un menor nivel de inducción por amonio, lo que acentúa la diferencia en los niveles de expresión en presencia de amonio y de NO. Este comportamiento marca una diferencia, que podemos considerar menor, entre las dos estirpes analizadas. En cualquier caso, el análisis conjunto de los datos obtenidos con los dos procedimientos experimentales utilizados indica que en las dos estirpes la presencia de amonio determina una inducción de la expresión de *FHG3*, más evidente durante la fase de germinación de las esporas, y que la exposición a NO no tiene un efecto notable en la regulación de la expresión de *FHG3*.

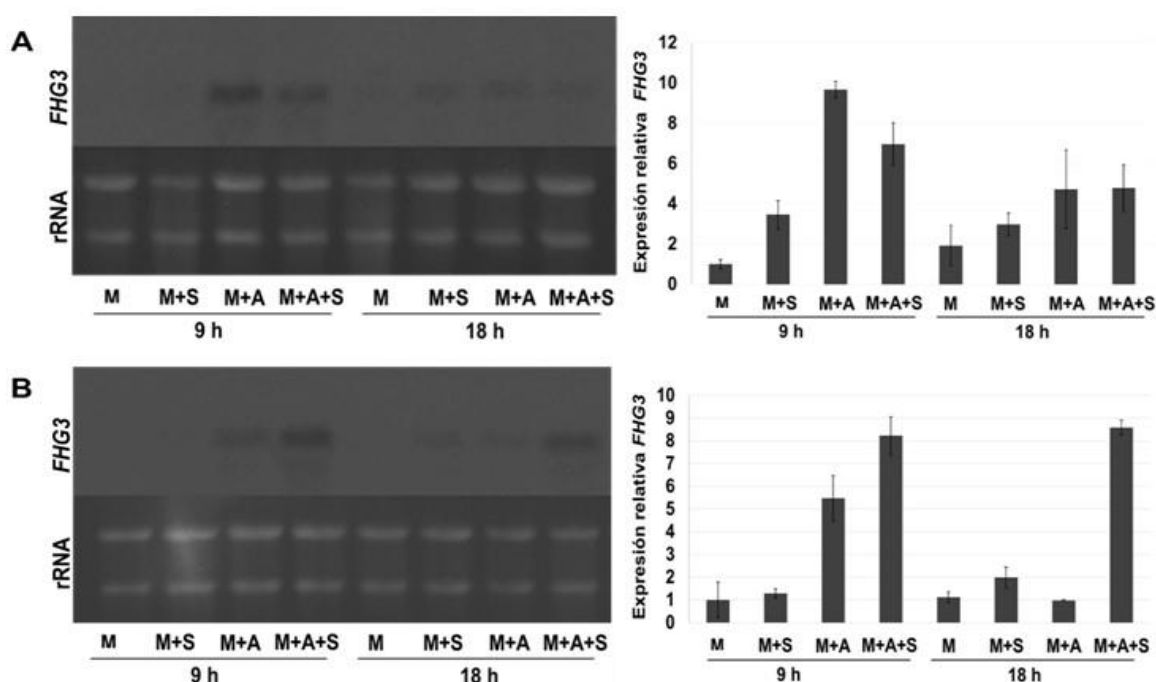


Figura 23. Análisis de expresión del gen *FHG3* de las estirpes FOP-SP1 (Panel A) y FOP-SP4 (panel B) durante el desarrollo y en condiciones de estrés nitrosativo. En cada panel la figura de la izquierda presenta los resultados de una hibridación Northern blot y el histograma de la derecha los resultados de la cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR. Las muestras de RNA utilizadas en ambos tipos de análisis corresponden a muestras derivadas de esporas cultivadas durante 9 o 18 h en medio mínimo suplementado con 1 % glucosa (M) o medio mínimo suplementado con 1 % glucosa y con 10 mM de tartrato amónico (M+A), en ausencia o en presencia de 500 μ M de SNP

(+S). Los datos de RT-qPCR mostrados representan las medias de 3 experimentos (réplicas biológicas). Los datos de expresión representan los niveles de expresión relativa del gen *FHG3* normalizados en relación con el nivel de expresión del gen *Efa1* y referidos a los valores de expresión de *FHG3* a 9 horas en medio M (MMG).

3.5.2.4 Expresión de *FHG4*

Finalmente, se analizó la expresión del gen *FHG4* en las mismas condiciones. En este caso los resultados obtenidos tanto por Northern blot como por RT-qPCR indican que el gen se expresa a niveles mínimos en todas las condiciones analizadas y que no responde, a nivel transcripcional, a ninguno de los factores evaluados en nuestro análisis. Probablemente *FHG4* codifica efectivamente una proteína de tipo flavohemoglobina, pero los procesos en los que pueda desempeñar una función dada, sea ésta cual sea, no parecen estar relacionados con desarrollo, con respuesta a amonio y con exposición a NO (respuesta a condiciones de estrés nitrosativo).

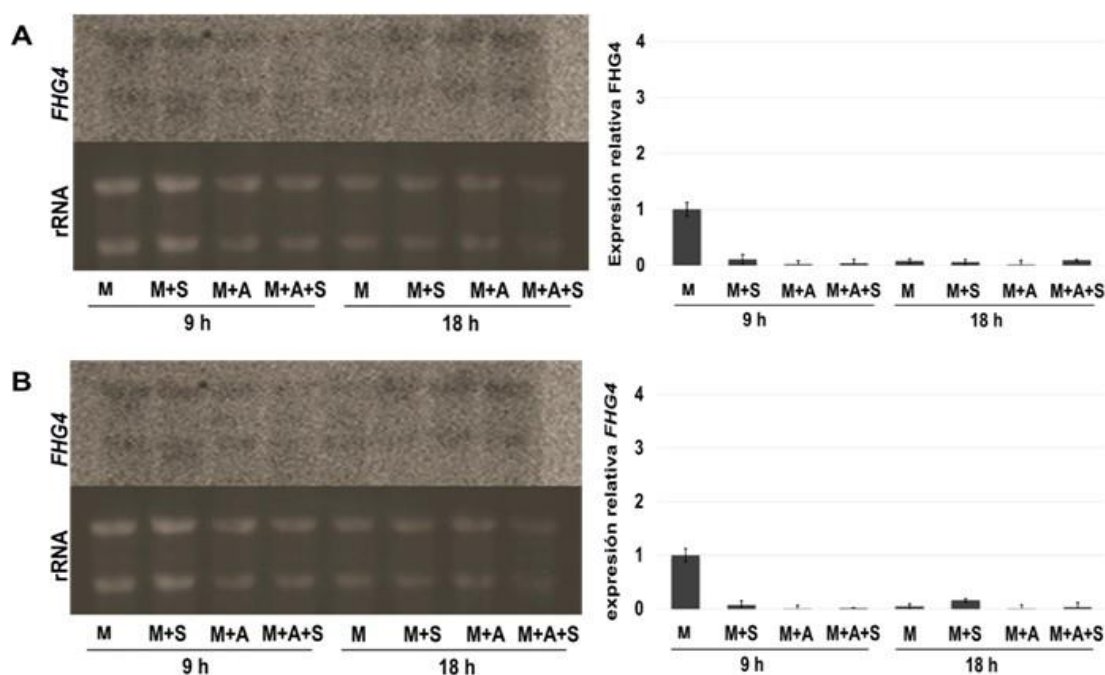


Figura 24. Análisis de expresión del gen *FHG4* de las estirpes FOP-SP1 (Panel A) y FOP-SP4 (panel B) durante el desarrollo y en condiciones de estrés nitrosativo. En cada panel la figura de la izquierda presenta los resultados de una hibridación Northern blot y el histograma de la derecha los resultados de la cuantificación de la expresión mediante RT-qPCR. Las muestras de RNA utilizadas en ambos tipos de análisis corresponden a muestras derivadas de esporas cultivadas durante 9 o 18 h en medio mínimo suplementado con 1 % glucosa (M) o medio mínimo suplementado con 1 % glucosa y con 10 mM de tartrato amónico (M+A), en ausencia o en presencia de 500 μ M de SNP (+S). Los datos de RT-qPCR mostrados representan las medias de 3 experimentos (réplicas biológicas). Los datos de expresión representan los niveles de expresión relativa del gen *FHG4* normalizados en relación con el nivel de expresión del gen *Efa1* y referidos a los valores de expresión de *FHG3* a 9 horas en medio M (MMG).

3.5.3 Análisis de expresión de los genes *FHG* en plantas de judía infectadas con estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Los patrones de expresión de los cuatro genes *FHG* en relación con los factores analizados son diferentes, lo que permite deducir que las proteínas codificadas pueden participar en procesos distintos. En el contexto de nuestro trabajo estamos interesados de forma particular en la posible participación de las enzimas de tipo flavohemoglobina en desarrollo y en patogenicidad. Una vez analizados los patrones de expresión de los cuatro genes *FHG* durante el crecimiento saprofítico decidimos abordar a continuación el estudio de los niveles de expresión de los genes *FHG* durante la interacción del patógeno con su huésped.

Decidimos realizar ensayos de infección sobre plantas de judía con las estirpes silvestres de *F. oxysporum* FOP-SP1 y FOP-SP4 utilizando un sistema de cultivo hidropónico con el medio de cultivo de plantas Plant growth medium PGM (descrito en la sección 2.2.1. de Materiales y Métodos) por considerarse un sistema de cultivo limpio y libre de materia orgánica y organismos parásitos y patógenos. Además mediante este tipo de cultivo los experimentos son independientes de fenómenos meteorológicos como luz, temperatura y humedad relativa, obteniéndose además muestras biológicas libres de contaminación. Otra de las ventajas es la facilidad para realizar un seguimiento continuo del estado de desarrollo de la planta y del progreso de la enfermedad. En ningún caso el progreso de la enfermedad es igual al observado en experimentos de infección realizados en macetas con medio de cultivo sólido. Ésta progresa siempre más lentamente en cultivos hidropónicos. No obstante, la distinción entre plantas inoculadas con la estirpe muy virulenta y con la estirpe poco virulenta, tanto en el número de hojas cloróticas como en el grado de necrosis en el sistema vascular, puede hacerse de manera muy similar en ambas condiciones de cultivo de las plantas.

Las raíces de plántulas de 10 días de edad se lavaron con agua destilada estéril y con tijeras estériles se cortaron los ápices radiculares. A continuación éstos fueron sumergidos en una solución de esporas 1×10^6 esporas/ml durante 5 minutos. Seguidamente se retiraron y se traspasaron a tubos falcon de 50 ml con 30 ml de medio de cultivo líquido (PGM), tubos que fueron cubiertos con papel aluminio y sellados con parafilm para evitar la transpiración y con el objeto de mantener constante el volumen de medio de cultivo. Los cultivos hidropónicos fueron incubados a 25°C en un fitotrón a 60-80 % de humedad relativa con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La evaluación se realizó tomando

muestras de raíz a los 1, 2 y 3 días después de la inoculación, muestras de hipocotilo a los 5 y 7 días después de la inoculación y muestras de tallo a los 14 y 21 días después de la inoculación. Las muestras de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* fueron colectadas y conservadas a -80°C. El ARN total se extrajo siguiendo el método descrito en la sección 2.6.4.2 de Materiales y Métodos. La calidad del ARN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa en TAE 1X y por espectrofotometría en el NanoDrop N-1000.

En base a los resultados obtenidos en el análisis de expresión de los genes de *FHG* durante el crecimiento saprofítico mediante análisis tipo Northern y RT-qPCR se decidió evaluar la expresión de estos genes en la interacción con el huésped mediante RT-qPCR. La síntesis de cDNA y el procedimiento de preparación de las reacciones de RT-qPCR se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.12.2 y 2.12.3 de Materiales y Métodos. Los oligonucleótidos utilizados en reacciones de RT-qPCR son los que se utilizaron para los análisis de expresión durante el crecimiento saprofítico descritos en las secciones 3.5.1 y 3.5.2 de Resultados.

3.5.3.1 Análisis de expresión de los genes *FHG* en plantas de judía infectadas con FOP-SP1.

En la Figura 25 se presentan los patrones de expresión de los genes *FHG* de la estirpe FOP-SP1 durante la interacción con plantas de judía variedad “blanca riñón”. En el caso de *FHG1* se observa un aumento en su nivel de expresión en raíz a los 3 dpi, duplicándose éste en relación con la situación de referencia considerada, 1 dpi. En hipocotilo a los 7 dpi el nivel de expresión detectado ha aumentado aún más (se triplica en relación con la situación de referencia) y parece mantenerse constante en fases posteriores del proceso de infección, concretamente a los 14 dpi en tallo (Panel A). En el caso de *FHG2* el análisis llevado a cabo sugiere que también parece aumentar, aunque en menor medida, su nivel de expresión desde el día 3 dpi. Sin embargo, el análisis estadístico demuestra que las diferencias observadas no son significativas (Panel B). La cuantificación de los niveles de expresión de los genes *FHG3* (Panel C) y *FHG4* (Panel D) indica que ésta es muy uniforme a lo largo del proceso de infección, no observándose variaciones notables en los tiempos considerados en este estudio para ninguno de los dos genes.

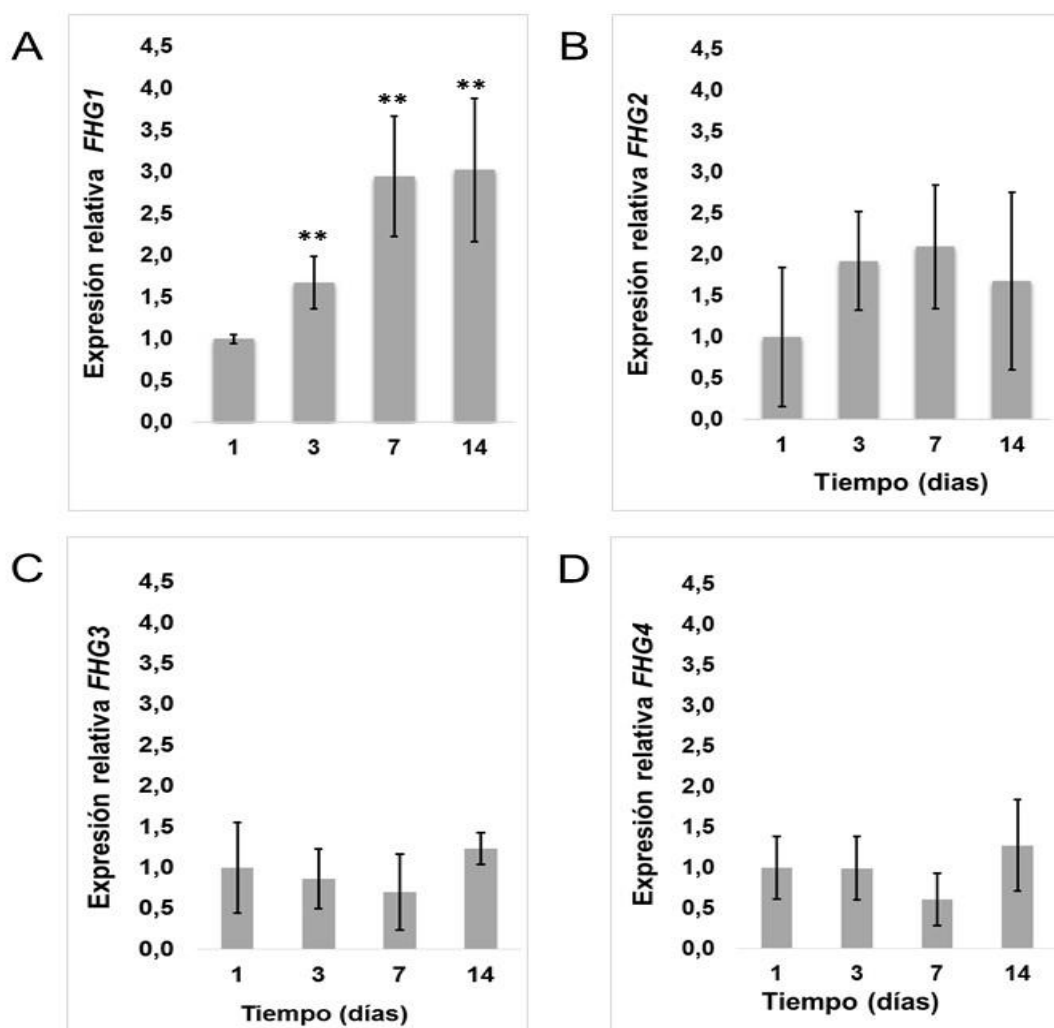


Figura 25. Análisis de expresión *in planta* mediante RT-qPCR de los genes *FHG* de FOP-SP1. (A): gen *FHG1*; (B): gen *FHG2*; (C): gen *FHG3*; y (D): gen *FHG4*. Los números que identifican las barras muestran los tiempos (días) después de la inoculación (dpi) en los que fueron tomadas las muestras: 1 y 3: Raíz, 7: hipocotilo y 14: tallo. Los datos presentados muestran los valores medios (\pm DE) de tres experimentos independientes. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados tomando como referencia el nivel de expresión del gen *Efa1* (Factor de elongación alpha 1), considerado de expresión constitutiva. Los niveles de expresión de cada gen en cada tiempo están referidos a su nivel de expresión en la muestra tomada 1 dpi. Diferencias significativas (“t-test” de Student) fueron observadas en las condiciones “3”, “7” y “14” dpi (** $p < 0.001$) en el análisis de expresión del gen *FHG1*.

3.5.3.2 Análisis de expresión de los genes *FHG* en plantas de judía infectadas con FOP-SP4

En la Figura 26 se presenta el análisis de expresión de los genes *FHG* de la estirpe FOP-SP4 durante su interacción con plantas de judía variedad “blanca riñón”. Se comprueba que la situación es muy similar a la observada en el caso de infección producida por la estirpe FOP-SP1. Sólo se observan diferencias significativas en los niveles de expresión

en relación con la condición de referencia (1 dpi) en el caso del gen *FHG1*, cuya expresión aumenta en raíz a los 3 dpi y lo hace aún más en hipocotilo a los 7 dpi (Panel A). Este aumento no parece mantenerse a lo largo de tiempo, marcando una diferencia menor en comparación con lo que sucede en la interacción con FOP-SP1, ya que decae a los 14 dpi. En este sistema los niveles de expresión de los genes *FHG2*, *FHG3* y *FHG4* no muestran variaciones a lo largo del tiempo durante la interacción (Paneles B, C y D).

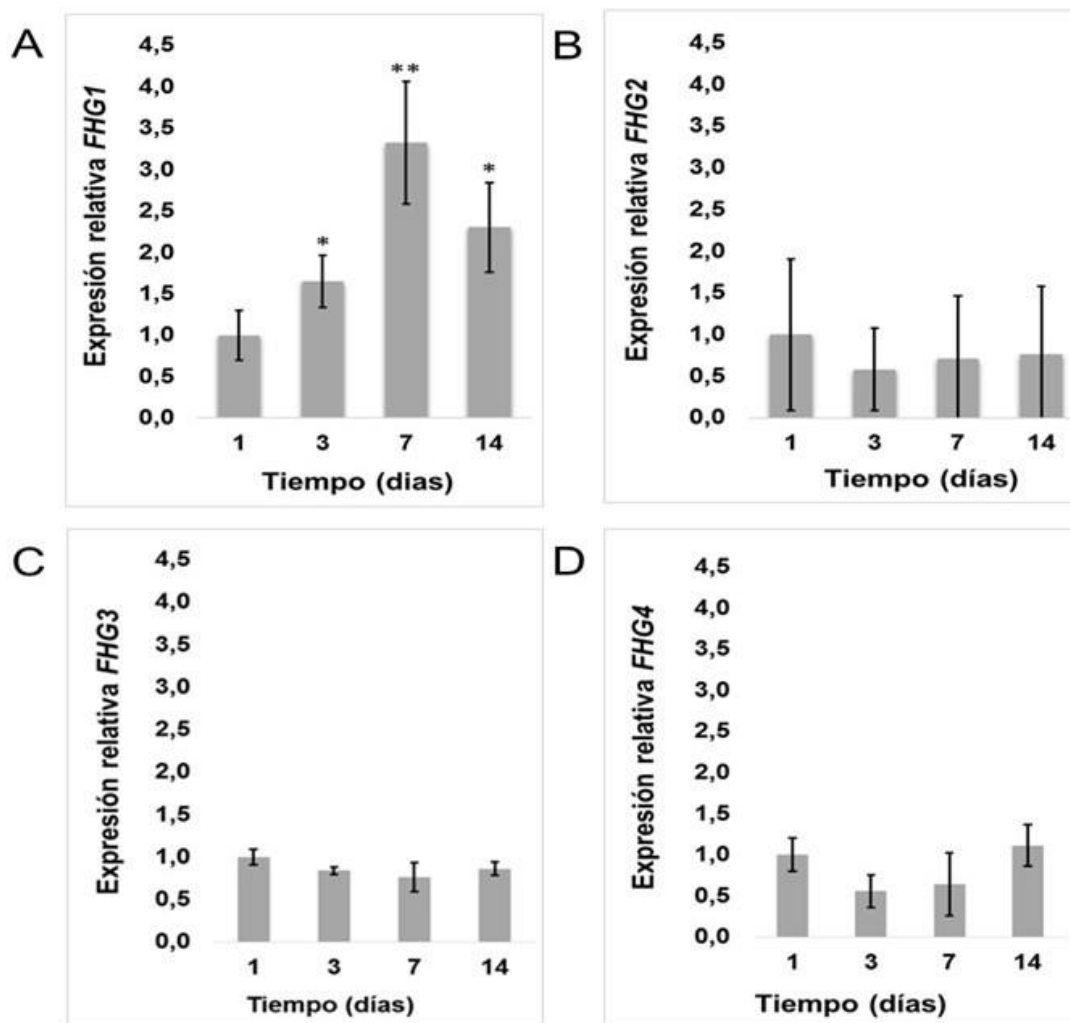


Figura 26. Análisis de expresión *in planta* mediante qPCR de los genes FHG de FOP-SP4. (A): gen *FHG1*; (B): gen *FHG2*; (C): gen *FHG3*; y (D): gen *FHG4*. Los números que identifican las barras muestran los tiempos (días) después de la inoculación (dpi) en los que fueron tomadas las muestras: 1 y 3: Raíz; 7: hipocotilo; y 14: tallo. Los datos presentados muestran los valores medios (\pm SD) de tres experimentos independientes. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados tomando como referencia el nivel de expresión del gen *Efa1* (Factor de elongación alpha 1), considerado de expresión constitutiva. Los niveles de expresión de cada gen en cada tiempo están referidos a su nivel de expresión en la muestra tomada 1 dpi. Diferencias significativas ("t-test" de Student) fueron observadas en las condiciones "3" y "14" dpi (* $p < 0,05$) y "7" dpi (** $p < 0,001$) en el análisis de expresión del gen *FHG1*.

3.6 Análisis funcional de los genes *FHG*

Los análisis de expresión durante el crecimiento saprofítico en medio de cultivo indican que los cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina de *F. oxysporum* f. sp *phaseoli* muestran patrones diferentes lo que permite proponer que las proteínas codificadas puedan participar en procesos fisiológicos distintos. Con el objeto de obtener información sobre los procesos en los que cada una de las cuatro proteínas *FHG* pudiera participar decidimos llevar a cabo la caracterización funcional de los genes codificadores de las mismas mediante la obtención y caracterización de mutantes deficientes de cada uno de ellos. Para generar mutantes deficientes en cada uno de los genes se diseñó una estrategia basada en el reemplazamiento génico del alelo silvestre correspondiente por un alelo mutante en el que la región estructural completa del gen, o una parte del mismo, ha sido sustituida por una fusión génica que permite la expresión del gen de resistencia a higromicina B bajo el control de secuencias reguladoras funcionales en hongos filamentosos. Esta fusión génica queda flanqueada en el plásmido de reemplazamiento génico por secuencias de ADN genómico específicas del gen de interés, en cada caso derivadas de las regiones inmediatamente adyacentes a los extremos 5' y 3' de la región codificante.

El esquema de trabajo en todos los casos fue el mismo. Para cada gen, a partir de ADN genómico de FOP-SP1 se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1 kb de tamaño de la región flanqueante 5' y un segundo fragmento de ADN del mismo tamaño de la región flanqueante 3'. Estos fragmentos se amplificaron con oligonucleótidos específicos diseñados a tal efecto. Para cada gen se construyó un plásmido binario clonando los fragmentos flanqueantes 5' y 3' específicos a ambos lados del casete de expresión de la higromicina. Con cada uno de estos plásmidos se transformó *A. tumefaciens* por electroporación y con las cepas transformantes seleccionadas en cada caso se llevó a cabo una transformación de FOP-SP1 y de FOP-SP4. Posteriormente, entre los transformantes obtenidos se identificaron mediante PCR y mediante hibridación Southern aquéllos en los que el alelo silvestre del gen considerado había sido reemplazado por el alelo mutante construido en cada caso.

3.6.1 Construcción de los vectores de transformación

Para la construcción de los vectores de transformación previamente se amplificaron mediante PCR fragmentos de ADN de las regiones flanqueantes 5' y 3' de los genes *FHG1*,

FHG2, *FHG3* y *FHG4*. Para amplificar los fragmentos de ADN genómico se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitían amplificar fragmentos de ADN de aproximadamente 1 kb de tamaño. La Tabla 20 presenta los códigos de los oligonucleótidos diseñados para llevar a cabo estas amplificaciones y los tamaños exactos de los fragmentos amplificados. Las posiciones de anillamiento de estos oligonucleótidos se muestran en las Figuras 29B y C, 31B y C, 33B y C y 35B y C. Las secuencias de todos los oligonucleótidos están recogidas en la Tabla 6 de la sección 2.12.5 de Materiales y Métodos.

Tabla 20. Códigos de los oligonucleótidos derivados de los genes *FHG* diseñados para la construcción de los vectores de reemplazamiento génico y tamaños de los fragmentos amplificados por PCR.

Gen	Región flanqueante	Código	Tamaño
Gen <i>FHG1</i>	5'	FHG175 RHG175	996 pb
	3'	FHG173 RHG173	998 pb
Gen <i>FHG2</i>	5'	FHG135 RHG135	946 pb
	3'	FHG133 RHG133	948 pb
Gen <i>FHG3</i>	5'	FHG185 RHG185	1065 pb
	3'	FHG183 RHG183	988 pb
Gen <i>FHG4</i>	5'	FHG155 RHG155	1037 pb
	3'	FHG153 RHG153	1012 pb

En la Figura 27 se presentan los productos de amplificación obtenidos en las reacciones de amplificación llevadas a cabo y visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

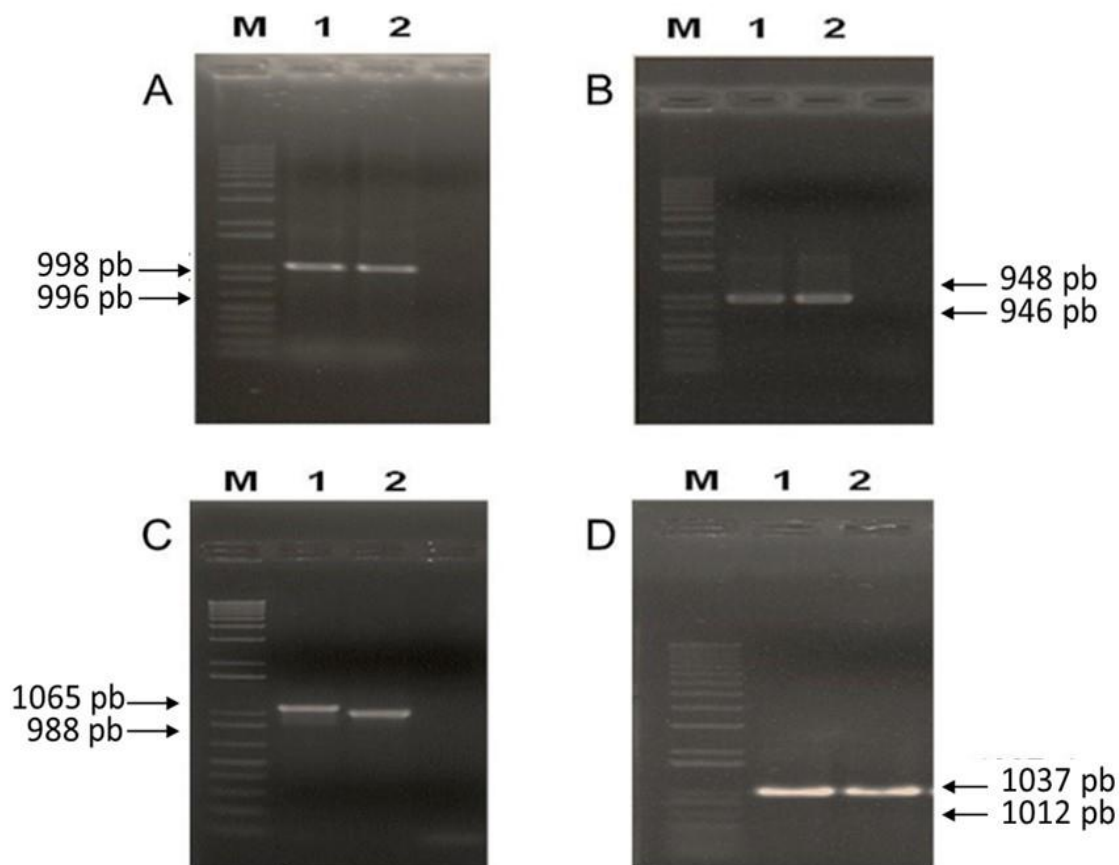


Figura 27. Productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de FOP-SP1 de las regiones flanqueantes 5' (carriles 1) y 3' (carriles 2) de los genes *FHG* con los oligonucleótidos específicos en cada caso. (A): *FHG1*, (B): *FHG2*, (C): *FHG3* y (D): *FHG4*. Las combinaciones de cebadores utilizadas en cada amplificación son las indicadas en la Tabla 20. Los productos de PCR fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. M: marcador de peso molecular 1 kp plus DNA ladder (invitrogen).

Los productos de PCR de cada uno de los genes fueron purificados y ligados en el vector pRF-HU2 previamente digerido con las enzimas de restricción *PacI* y *NT.BbvCI* utilizando el sistema User Friendly Cloning. Con las reacciones de ligación se llevaron a cabo transformaciones de células de *E. coli* cepa DH5 α mediante choque térmico. Para identificar colonias portadoras del plásmido de interés se llevó a cabo un escrutinio mediante PCR directa sobre colonia de una muestra representativa de las colonias obtenidas utilizando en cada caso los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de ADN de las regiones flanqueantes correspondientes. Se seleccionó finalmente una colonia positiva portadora del plásmido deseado en cada caso. Los plásmidos generados fueron denominados pRF-HU2-*FHG1*, pRF-HU2-*FHG2*, pRF-HU2-*FHG3* y pRF-HU2-*FHG4*. La Figura 28 muestra los mapas de restricción de estos plásmidos.

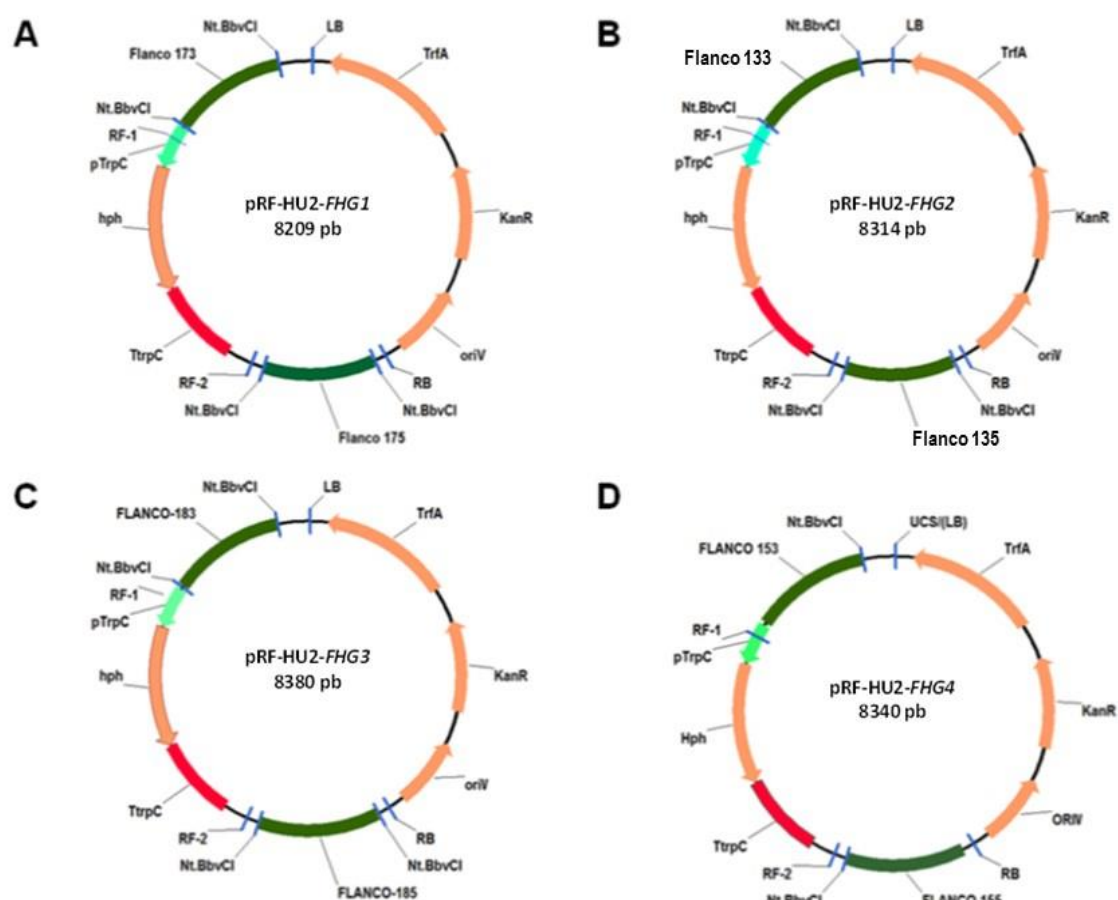


Figura 28. Mapa de restricción de los plásmidos construidos a partir del plásmido pRF-HU2 para el reemplazamiento génico de los genes *FHG* de FOP-SP1 y FOP-SP4. En cada caso el casete de resistencia a higromicina está flanqueado por fragmentos de ADN genómico específicos de las regiones flanqueantes en 5' y en 3' de los genes *FHG1* (plásmido pRF-HU2-*FHG1*) (A), *FHG2* (plásmido pRF-HU2-*FHG2*) (B), *FHG3* (plásmido pRF-HU2-*FHG3*) (C) y *FHG4* (plásmido pRF-HU2-*FHG4*) (D).

3.6.2 Transformación de *A. tumefaciens*

Los plásmidos pRF-HU2-*FHG1*, pRF-HU2-*FHG2*, pRF-HU2-*FHG3* y pRF-HU2-*FHG4* fueron introducidos en *A. tumefaciens* cepa AGL1 mediante electroporación siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.9.5.2 de Materiales y Métodos. De entre las colonias transformantes obtenidas con cada plásmido se seleccionó una que fue utilizada para llevar a cabo la transformación de FOP-SP1 y FOP-SP4. La identidad del plásmido presente en cada una de las colonias seleccionadas fue verificada mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos de las regiones flanqueantes de cada uno de los cuatro genes.

3.6.3 Transformación de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* mediada por *A. tumefaciens*

La transformación de *F. oxysporum* mediada por *A. tumefaciens* se realizó siguiendo la metodología mostrada en los apartados 2.9.5.3 y 2.9.5.4 de Materiales y Métodos. Se transformó tanto la estirpe FOP-SP1 como la estirpe FOP-SP4. Los transformantes primarios que fueron apareciendo en las placas de medio selectivo en presencia de higromicina B fueron transferidos individualmente a placas de PDA con 75 µg/ml de higromicina e incubados durante 5 días a 25°C. En la estirpe muy virulenta FOP-SP1 se seleccionaron 96 transformantes para el gen *FHG1*, 72 transformantes para el gen *FHG2*, 102 transformantes para el gen *FHG3* y 85 transformantes para el gen *FHG4*. En la estirpe poco virulenta FOP-SP4 se seleccionaron 92 transformantes para el gen *FHG1*, 86 transformantes para el gen *FHG2*, 110 transformantes para el gen *FHG3* y 112 transformantes para el gen *FHG4*.

3.6.4 Identificación de mutantes por reemplazamiento génico de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Para el análisis de los transformantes primarios y la identificación de mutantes por reemplazamiento génico se partió de micelio tomado de placas PDA cultivadas durante 5 días. El micelio se transfirió a tubos eppendorf de 1,5 ml con Tris-HCl 10X. Este material fue utilizado para la extracción de ADN genómico haciendo uso del método de extracción rápido descrito en la sección 2.6.1.2 de Materiales y Métodos. El ADN genómico de cada transformante fue utilizado para identificar mediante PCR de forma rápida transformantes en los cuales se pudieran haber producido eventos de recombinación homóloga tanto en el extremo flanqueante 5' como en el extremo flanqueante 3' entre el alelo silvestre del gen y el alelo mutante en cada caso clonado en el plásmido de transformación correspondiente.

Para la discriminación de transformantes "candidato", en cada uno de los de los cuatro genes analizados se diseñaron oligonucleótidos derivados de secuencias localizadas en las regiones flanqueantes, bien 5' bien 3', pero inmediatamente aguas arriba o aguas abajo de los fragmentos de ADN clonados en el plásmido de reemplazamiento génico correspondiente. Los códigos de los oligonucleótidos diseñados se presentan en la Tabla 21 y las posiciones que ocupan las secuencias diana de hibridación de los mismos se muestran en las Figuras 29B y C, 31B y C, 33B y C y 35B y C. Sus secuencias se presentan en la Tabla 6 de la sección 2.12.5 de Materiales y Métodos.

Tabla 21. Códigos de los oligonucleótidos derivados de los genes *FHG* y del gen *hph* utilizados para la identificación de transformantes candidato y tamaños de los productos de PCR esperados en caso de ocurrencia de recombinación homóloga en la región correspondiente.

Gen	Región flanqueante	Código	Tamaño
Gen <i>FHG1</i>	5'	FHG175-KN-FW HphBC	2640 pb
	3'	RHG173-KN-RV HphAC	1838 pb
Gen <i>FHG2</i>	5'	FHG135-KN-FW HphBC	2535 pb
	3'	RHG133-KN-RV HphAC	2462 pb
Gen <i>FHG3</i>	5'	FHG185-KN-FW HphBC	2431 pb
	3'	RHG183-KN-RV HphAC	1945 pb
Gen <i>FHG4</i>	5'	FHG155-KN-FW HphBC	2421 pb
	3'	RHG153-KN-RV HphAC	2097 pb

Para cada uno de los genes, la amplificación en un transformante primario dado de un fragmento de ADN del tamaño esperado (conocido para cada gen en concreto) con una combinación de oligonucleótidos particular que incluye el oligonucleótido derivado de la región inmediatamente aguas arriba del fragmento de ADN genómico clonado en el plásmido de reemplazamiento génico y correspondiente a la región flanqueante 5' y el oligonucleótido HphBC, derivado del casete de resistencia a higromicina, permitiría identificar un evento de recombinación homóloga en el extremo 5' del gen de interés entre el alelo silvestre y el alelo mutante. De la misma manera, la amplificación en un transformante primario dado de un fragmento de ADN del tamaño esperado (conocido para cada gen en concreto) con una combinación de oligonucleótidos particular que incluye el oligonucleótido derivado de la región inmediatamente aguas abajo del fragmento de ADN genómico clonado en el plásmido de reemplazamiento génico y derivado de la región flanqueante 3' y el oligonucleótido HphAC, derivado del casete de resistencia a higromicina, permitiría identificar un evento de recombinación homóloga en el extremo 3' del gen de interés del alelo silvestre y el alelo mutante (ver en las Figuras 29, 31, 33 y 35 la ubicación

de los cebadores representados en color naranja). La amplificación simultánea de ambos productos de amplificación permitiría identificar transformantes primarios derivados de un evento de reemplazamiento génico que serían seleccionados para análisis posteriores.

3.6.4.1 Identificación de transformantes del gen *FHG1*

En la Figura 29 se presenta de forma esquemática el modo en el que deben alinearse el alelo silvestre del gen *FHG1* y la construcción generada y clonada en el plásmido pRF-HU2-*FHG1* y la estructura que presentará el alelo mutante del gen *FHG1* derivado de dos eventos de recombinación homóloga en ambas regiones flanqueantes de la región estructural del gen, es decir, la estructura del alelo mutante de *FHG1* consecuencia del remplazamiento génico.

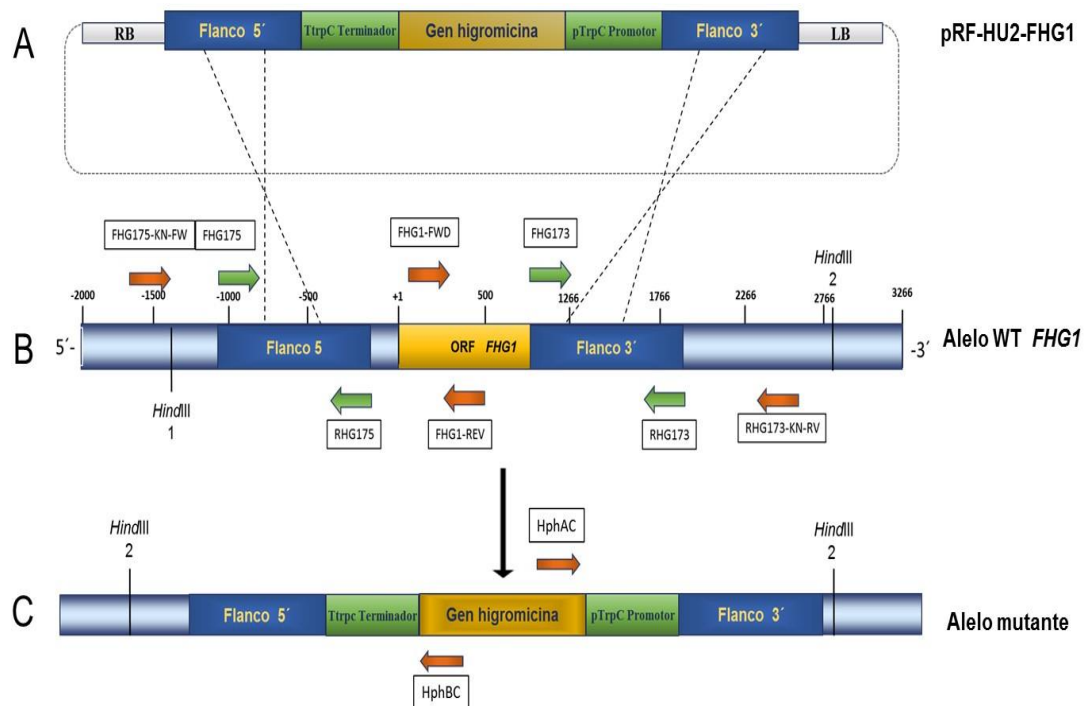


Figura 29. Estrategia de reemplazamiento génico del gen *FHG1*. A: Representación simplificada del plásmido pRF-HU2-*FHG1* con la construcción de reemplazamiento del gen *FHG1*. B: Esquema del entorno genómico del alelo silvestre del gen *FHG1*. Se indican (cajas de color azul intenso) las regiones en los extremos flanqueantes 5' y 3' en las que debe producirse recombinación homóloga para que tenga lugar el reemplazamiento génico de *FHG1*. C: Estructura del alelo mutante generado mediante reemplazamiento génico como consecuencia de un doble evento de recombinación homóloga en las regiones flanqueantes 5' y 3' de *FHG1*. La ubicación de las dianas de hibridación de los cebadores utilizados para amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' clonadas en el plásmido pRF-HU2-*FHG1* se representa mediante flechas de color verde (B). La ubicación de la diana de anillamiento de los cebadores utilizados para la detección de la ocurrencia de recombinación homóloga en una región flanqueante u otra se representa mediante flechas de color naranja (B y C). Se indica la posición de las dianas de restricción de la enzima *HindIII* en el alelo silvestre y en el alelo resultante del reemplazamiento génico (*HindIII* no corta el plásmido pRF-HU2-*FHG1*).

La identificación de “transformantes candidatos” en los que se ha producido el reemplazamiento génico del gen *FHG1* se realizó mediante reacciones de PCR utilizando la combinación de cebadores FHG175-KN-FW y HphBC y RHG173-KN-RV y HphAC mostrados en la Figura 29B y 29C. En el primer caso, la amplificación de un fragmento de 2640 pares bases correspondiente a la región flanqueante 5’ sería indicativa de recombinación homóloga en esta región. En el segundo caso, la amplificación de un fragmento de 1838 pares de bases correspondiente a la región flanqueante 3’ sería indicativa de recombinación homóloga en esta región. En la Figura 30, se muestran resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa los productos de amplificación obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con ambas combinaciones de cebadores en una muestra representativa de transformantes. En un buen número de transformantes primarios se amplificaron los dos fragmentos diagnósticos de recombinación homóloga. Estos son transformantes en los que debe haberse producido el reemplazamiento del gen *FHG1*. En total, para la estirpe muy virulenta FOP-SP1 se obtuvieron 16 transformantes positivos candidatos de 96 analizados. Para la estirpe poco virulenta FOP-SP4 se obtuvieron 22 transformantes positivos de 92 analizados. En la Figura 30 se muestran los productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de las cepas mutantes del gen *FHG1* de FOP-SP1 y FOP-SP4.

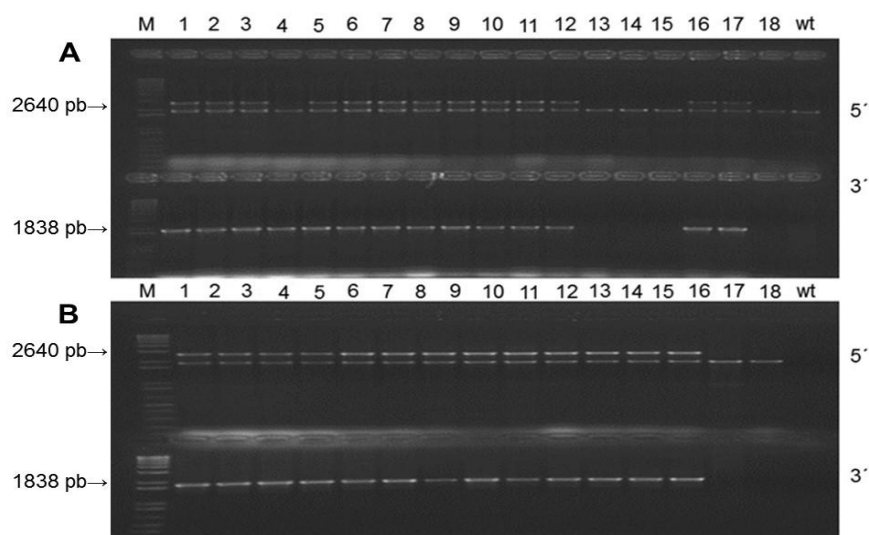


Figura 30. Productos de PCR obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos FHG175-KN-FW y HphBC (línea superior en cada gel) (5’) y RHG173-KN-RV y HphAC (línea inferior en cada gel) (3’) utilizando como molde ADN genómico de los transformantes obtenidos con el plásmido pRF-HU2-*FHG1*. A: Transformantes FOP-SP1 (carreras 1 a 18) y B: Transformantes FOP-SP4 (carreras 1 a 18). Como control se incluyeron reacciones de PCR llevadas a cabo con los mismos oligonucleótidos utilizando como molde ADN genómico de la estirpes FOP-SP1 o FOP-SP4 no transformadas. M: marcador de peso molecular 1 kp plus DNA ladder (Invitrogen).

3.6.4.2 Identificación de transformantes del gen *FHG2*

En la Figura 31 se presenta de forma esquemática el modo en el que deben alinearse el alelo silvestre del gen *FHG2* y la construcción generada y clonada en el plásmido pRF-HU2-*FHG2* y la estructura que presentará el alelo mutante del gen *FHG2* derivado de dos eventos de recombinación homóloga en ambas regiones flanqueantes de la región estructural del gen, es decir, la estructura del alelo mutante de *FHG2* consecuencia del reemplazamiento génico.

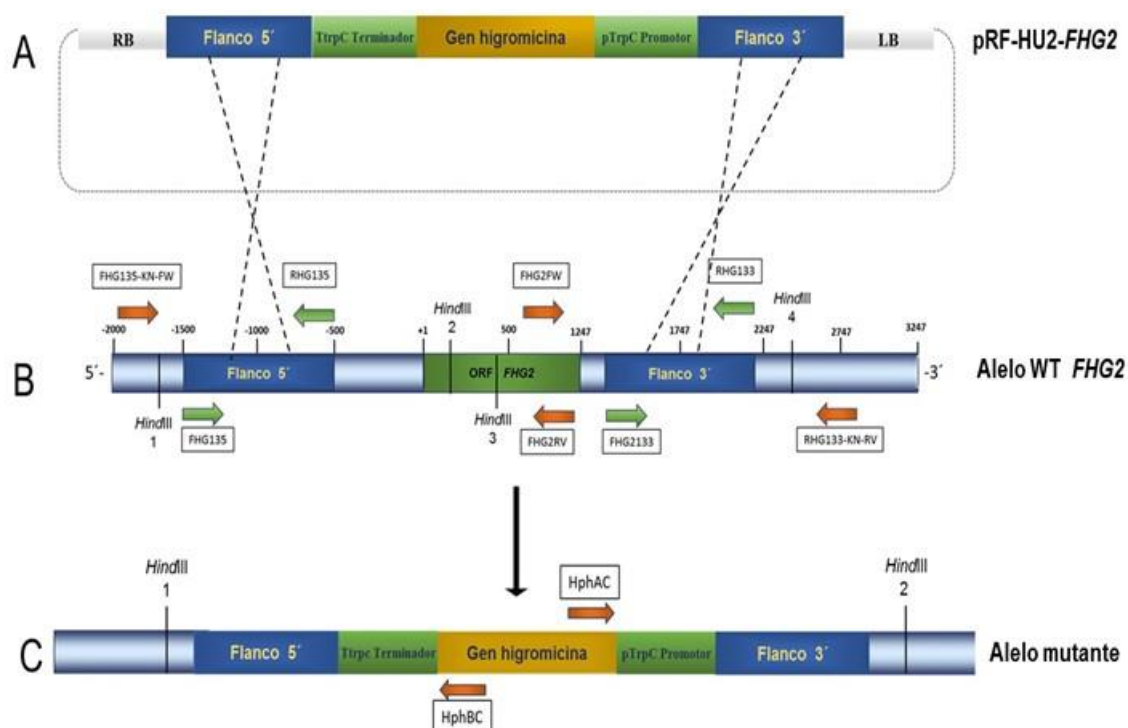


Figura 31. Estrategia de reemplazamiento génico del gen *FHG2*. A: Representación simplificada del plásmido pRF-HU2-*FHG2* con la construcción de reemplazamiento del gen *FHG2*. B: Esquema del entorno genómico del alelo silvestre del gen *FHG2*. Se indican las regiones en los extremos flanqueantes 5' y 3' en las que debe producirse recombinación homóloga para que tenga lugar el reemplazamiento génico de *FHG2*. C: Estructura del alelo mutante generado mediante reemplazamiento génico como consecuencia de un doble evento de recombinación homóloga en las regiones flanqueantes 5' y 3' de *FHG2*. La ubicación de las dianas de hibridación de los cebadores utilizados para amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' clonadas en el plásmido pRF-HU2-*FHG2* se representa mediante flechas de color verde (B). La ubicación de las dianas de anillamiento de los cebadores utilizados para la detección de la ocurrencia de recombinación homóloga en una región flanqueante u otra se representa mediante flechas de color naranja (B y C). Se indica la posición de las dianas de restricción de la enzima *HindIII* en el alelo silvestre y en el alelo resultante del reemplazamiento génico (*HindIII* no corta el plásmido pRF-HU2-*FHG2*).

La identificación de “transformantes candidatos” en los que se ha producido el reemplazamiento génico del gen *FHG2* se realizó mediante reacciones de PCR utilizando la combinación de cebadores FHG135-KN-FW y HphBC y RHG133-KN-Rv y HphAC

mostrados en la Figura 31B y 31C. En el primer caso, la amplificación de un fragmento de 2537 pares bases correspondiente a la región flanqueante 5' sería indicativa de recombinación homólogo en esta región. En el segundo caso, la amplificación de un fragmento de 2462 pares de bases correspondiente a la región flanqueante 3' sería indicativa de recombinación homóloga en esta región.

En la Figura 32 se muestran resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa los productos de amplificación obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con ambas combinaciones de cebadores en una muestra representativa de transformantes. También en este caso en un buen número de transformantes primarios se amplificaron los dos fragmentos diagnósticos de recombinación homóloga.

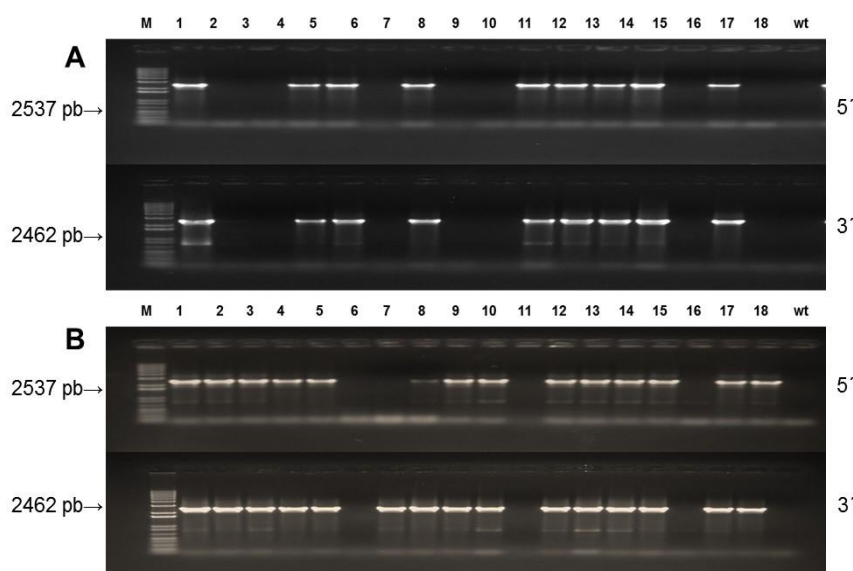


Figura 32. Productos de PCR obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos FHG135-KN-FW y HphBC (línea superior en cada gel) (5') y RHG133-KN-RV y HphAC (línea inferior en cada gel) (3') utilizando como molde ADN genómico de los transformantes obtenidos con el plásmido pRF-HU2-FHG2. A: Transformantes FOP-SP1 (carreras 1 a 18) y B: Transformantes FOP-SP4 (carreras 1 a 18). Como control se incluyeron reacciones de PCR llevadas a cabo con los mismos oligonucleótidos utilizando como molde ADN genómico de las estirpes FOP-SP1 o FOP-SP4 no transformadas (wt). M: marcador de peso molecular 1 kp plus DNA ladder (Invitrogen).

Estos son transformantes en los que debe haberse producido el reemplazamiento del gen *FHG2*. Los fragmentos amplificados mostraron el tamaño esperado y posiblemente ocurrió un doble evento de recombinación homóloga. En total, para la estirpe muy virulenta FOP-SP1 se obtuvieron 48 transformantes positivos candidatos de 72 analizados. Para la estirpe poco virulenta FOP-SP4 se obtuvieron 42 transformantes positivos de 88 analizados.

3.6.4.3 Identificación de transformantes del gen *FHG3*

En la Figura 33 se muestran de forma esquemática el modo en el que deben alinearse el alelo silvestre del gen *FHG3* y la construcción generada y clonada en el plásmido pRF-HU2-*FHG3* y la estructura que presentará el alelo mutante del gen *FHG3* derivado de dos eventos de recombinación homóloga en ambas regiones flanqueantes de la región estructural del gen, es decir, la estructura del alelo mutante de *FHG3* consecuencia del reemplazamiento génico.

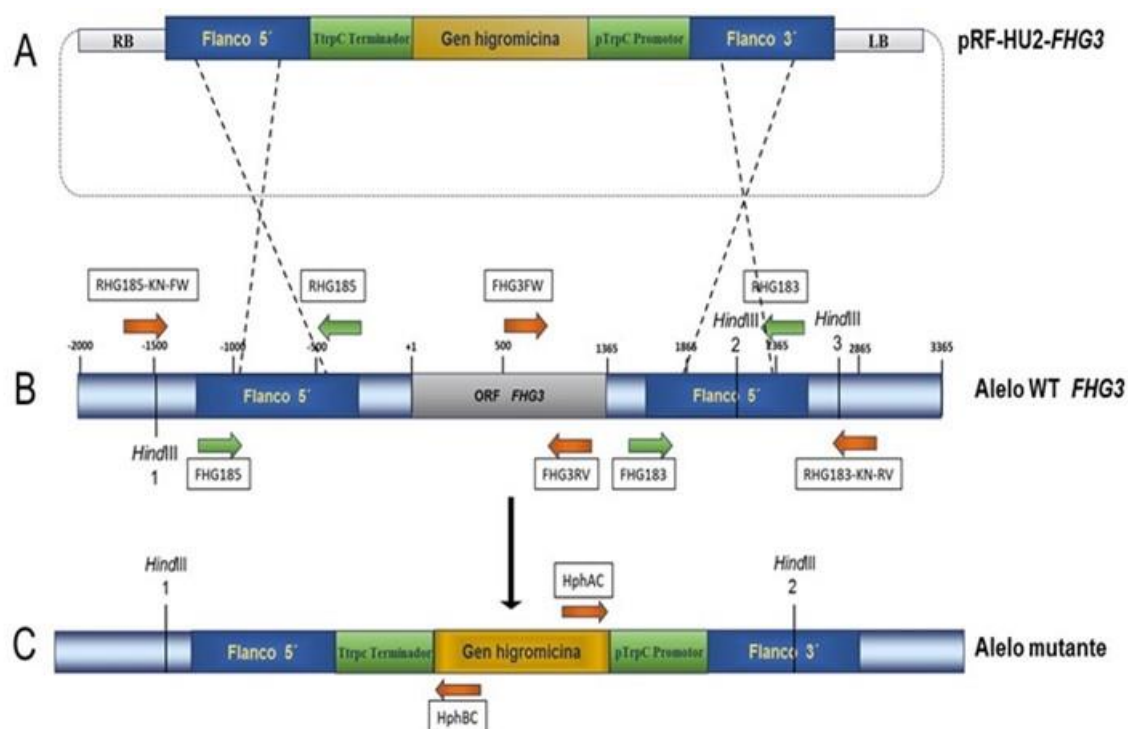


Figura 33. Estrategia de reemplazamiento génico del gen *FHG3*. A: Representación simplificada del plásmido pRF-HU2-*FHG3* con la construcción de reemplazamiento del gen *FHG2*. B: Esquema del entorno genómico del alelo silvestre del gen *FHG3*. Se indican las regiones en los extremos flanqueantes 5' y 3' en las que debe producirse recombinación homóloga para que tenga lugar el reemplazamiento génico de *FHG3*. C: Estructura del alelo mutante generado mediante reemplazamiento génico como consecuencia de un doble evento de recombinación homóloga en las regiones flanqueantes 5' y 3' de *FHG3*. La ubicación de las dianas de hibridación de los cebadores utilizados para amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' clonadas en el plásmido pRF-HU2-*FHG3* se representa mediante flechas de color verde (B). La ubicación de las dianas de anillamiento de los cebadores utilizados para la detección de la ocurrencia de recombinación homóloga en una región flanqueante u otra se representa mediante flechas de color naranja (B y C). Se indica la posición de las dianas de restricción de la enzima *HindIII* en el alelo silvestre y en el alelo resultante del reemplazamiento génico (*HindIII* no corta el plásmido pRF-HU2-*FHG3*).

La identificación de “transformantes candidato” en los que se ha producido el reemplazamiento génico del gen *FHG3* se realizó llevando a cabo reacciones de PCR utilizando la combinación de cebadores FHG185-KN-FW y HphBC y RHG83-KN-RV y

HphAC mostrados en la Figura 33B y 33C. La amplificación de un fragmento de 2431 pares de bases correspondiente a la región flanqueante 5' sería indicativa de recombinación homóloga en esta región. Igualmente, la amplificación de un fragmento de 1945 pares de bases correspondiente a la región flanqueante 3' sería indicativa de recombinación homóloga en esta región. En la Figura 34 se muestran resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa los productos de amplificación obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con ambas combinaciones de cebadores en una muestra representativa de transformantes. En un buen número de transformantes primarios se amplificaron los dos fragmentos diagnósticos de recombinación homóloga.

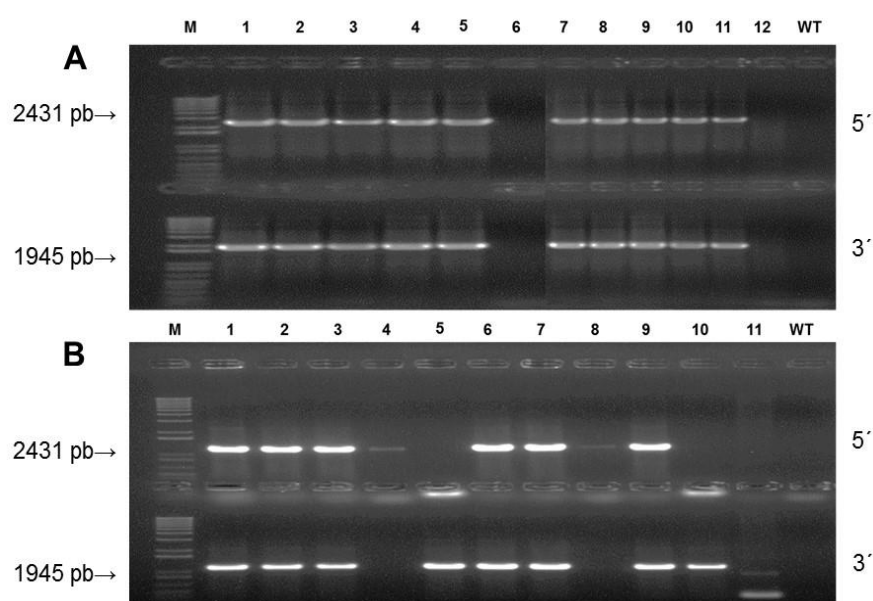


Figura 34. Productos de PCR obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos FHG185-KN-FW y HphBC (línea superior en cada gel) (5') y RHG183-KN-RV y HphAC (línea inferior en cada gel) (3') utilizando como molde ADN genómico de los transformantes obtenidos con el plásmido pRF-HU2-FHG3. A: Transformantes FOP-SP1 (carreras 1 a 12) y B: Transformantes FOP-SP4 (carreras 1 a 11). Como control se incluyeron reacciones de PCR llevadas a cabo con los mismos oligonucleótidos utilizando como molde ADN genómico de las estirpes FOP-SP1 o FOP-SP4 no transformadas (wt). M: marcador de peso molecular 1 kp plus DNA ladder (Invitrogen).

Los transformantes en los que se detecta amplificación de ambos productos de PCR, y éstos tienen el tamaño esperado, son aquellos en los que debe haberse producido el reemplazamiento del gen *FHG2*. En total, para la estirpe muy virulenta FOP-SP1 se obtuvieron 42 transformantes positivos de 102 analizados. Para la estirpe poco virulenta FOP-SP4 se obtuvieron 32 transformantes positivos de 110 analizados.

3.6.4.4 Identificación de transformantes del gen *FHG4*

En la Figura 35 se presenta el esquema del modo en el que deben alinearse el alelo silvestre del gen *FHG4* y la construcción generada y clonada en el plásmido pRF-HU2-*FHG4* y la estructura que presentará el alelo mutante del gen *FHG4* derivado de dos eventos de recombinación homóloga en ambas regiones flanqueantes de la región estructural del gen, es decir, la estructura del alelo mutante de *FHG4* consecuencia del remplazamiento génico.

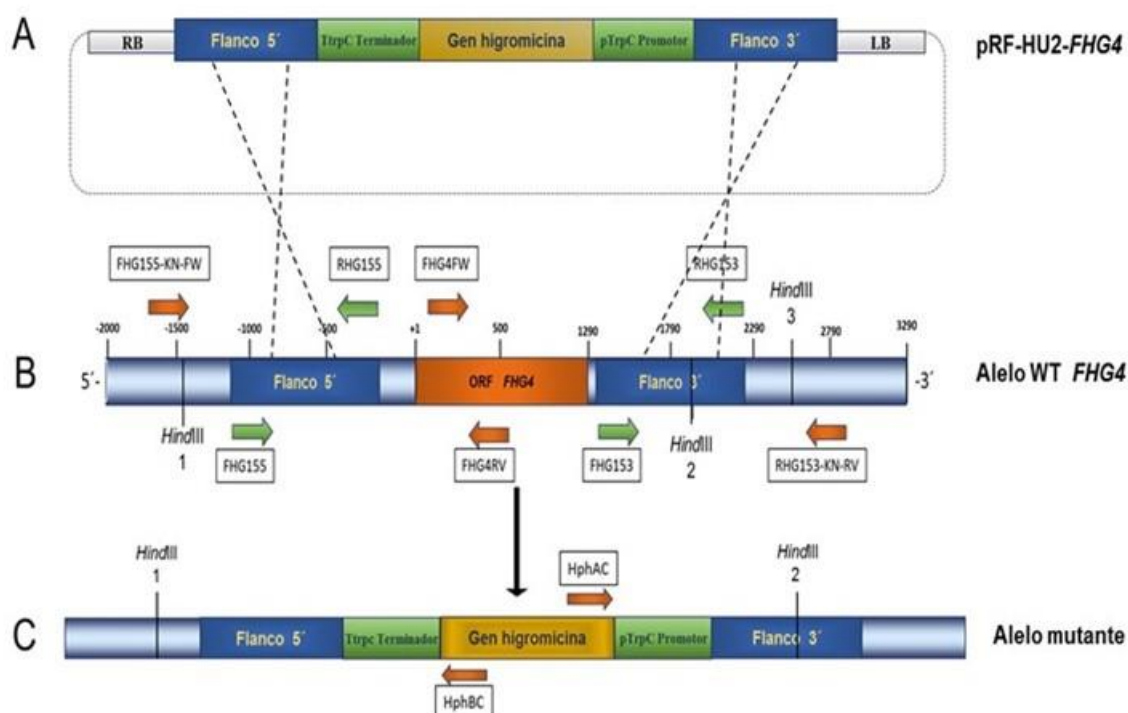


Figura 35. Estrategia de reemplazamiento génico del gen *FHG4*. A: Representación simplificada del plásmido pRF-HU2-*FHG4* con la construcción de reemplazamiento del gen *FHG4*. B: Esquema del entorno genómico del alelo silvestre del gen *FHG4*. Se indican las regiones en los extremos flanqueantes 5' y 3' en las que debe producirse recombinación homóloga para que tenga lugar el reemplazamiento génico de *FHG4*. C: Estructura del alelo mutante generado mediante reemplazamiento génico como consecuencia de un doble evento de recombinación homóloga en las regiones flanqueantes 5' y 3' de *FHG4*. La ubicación de las dianas de hibridación de los cebadores utilizados para amplificación de las regiones flanqueantes 5' y 3' clonadas en el plásmido pRF-HU2-*FHG4* se representa mediante flechas de color verde (B). La ubicación de las dianas de anillamiento de los cebadores utilizados para la detección de la ocurrencia de recombinación homóloga en una región flanqueante u otra se representa mediante flechas de color naranja (B y C). Se indica la posición de las dianas de restricción de la enzima *HindIII* en el alelo silvestre y en el alelo resultante del reemplazamiento génico (*HindIII* no corta el plásmido pRF-HU2-*FHG2*).

La identificación de transformantes en los que se ha producido el reemplazamiento génico del gen *FHG4* se realizó llevando a cabo reacciones de PCR utilizando la combinación de cebadores FHG155-KN-FW y HphBC y RHG153-KN-RV y HphAC mostrados en la Figura

35B y 35C. La amplificación de un fragmento de 2421 pares bases correspondiente a la región flanqueante 5' sería indicativa de recombinación homóloga en esta región. Por otro lado, la amplificación de un fragmento de 2097 pares de bases correspondiente a la región flanqueante 3' sería indicativa de recombinación homóloga en esta región. Como se observa en la Figura 36, en la que se muestran resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa los productos de amplificación obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con ambas combinaciones de cebadores en una muestra representativa de transformantes, en un buen número de transformantes primarios amplificaron los dos fragmentos indicadores de recombinación homóloga. Estos transformantes son aquellos en los que debe haberse producido el reemplazamiento del gen *FHG4*. En los mismos se detectó la amplificación de los fragmentos derivados de una y otra región flanqueante y ambos presentaban el tamaño esperado. En total, para la estirpe muy virulenta FOP-SP1 se obtuvieron 7 transformantes positivos candidatos de 110 analizados. Para la estirpe poco virulenta FOP-SP4 se obtuvieron 5 transformantes positivos de 112 analizados.

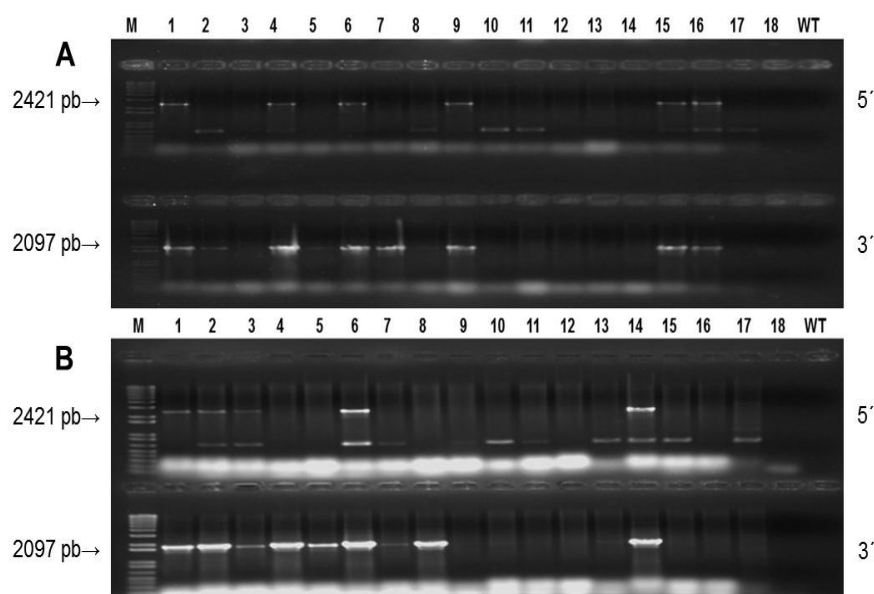


Figura 36. Productos de PCR obtenidos en reacciones de PCR llevadas a cabo con los oligonucleótidos FHG155-KN-FW y HphBC (línea superior en cada gel) (5') y RHG153-KN-RV y HphAC (línea inferior en cada gel) (3') utilizando como molde ADN genómico de los transformantes obtenidos con el plásmido pRF-HU2-*FHG4*. A: Transformantes FOP-SP1 (carreras 1 a 18) y B: Transformantes FOP-SP4 (carreras 1 a 18). Como control se incluyeron reacciones de PCR llevadas a cabo con los mismos oligonucleótidos utilizando como molde ADN genómico de las estirpes FOP-SP1 o FOP-SP4 no transformadas (wt). M: marcador de peso molecular 1 kp plus DNA ladder (Invitrogen).

3.7 Análisis mediante hibridación Southern de los transformantes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Los transformantes en los que fue posible identificar mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de doble recombinación homóloga en las regiones flanqueantes 5' y 3' bien del gen *FHG1*, del gen *FHG2*, del gen *FHG3* o del gen *FHG4* fueron analizados mediante hibridación de tipo Southern. Con el objeto de eliminar posibles núcleos no transformados y de garantizar la homocariosis del alelo "reemplazamiento" en los transformantes seleccionados, a partir de cada uno de ellos se obtuvieron cultivos monospóricos seleccionando esporas individuales en medio PDA suplementado con 75 µg/ml de higromicina B (en la mayor parte de los casos a partir de cada cepa en forma de cultivo monospórico se obtuvo un cultivo monospórico de "segunda generación" y de éste un cultivo monospórico de tercera generación, dados los problemas de heterocariosis que en algunos casos hemos detectado).

Finalmente los transformantes seleccionados y purificados fueron cultivados en medio líquido PDB con 50 µg/ml de higromicina y a partir del micelio recuperado se extrajo ADN genómico que fue utilizado en el análisis de hibridación Southern. En todos los casos, es decir, para la caracterización de los transformantes seleccionados para cada uno de los cuatro genes considerados, el análisis siguió la misma estrategia. En primer lugar se determinaría la presencia o ausencia en cada transformante de la banda de hibridación característica del alelo silvestre mediante hibridación con una sonda derivada de la región estructural del gen analizado. En segundo lugar se detectarían bien la banda correspondiente al alelo silvestre, bien la banda correspondiente al alelo reemplazamiento, mediante hibridación con una sonda derivada de la región 5' flanqueante del gen. Y finalmente, se confirmaría la identidad de la banda reemplazamiento mediante hibridación con una sonda derivada de la región estructural del gen que determina la resistencia a higromicina. Esta última hibridación permitiría, además, detectar la ocurrencia de integraciones adicionales del casete de resistencia a higromicina B en el genoma de los transformantes. Las sondas derivadas de la región codificante y de la región flanqueante 5' de cada gen en estudio y la sonda del gen de resistencia a higromicina B fueron marcadas mediante PCR con los cebadores mostrados en la Tabla 6 (ver Figuras 37, 38, 39 y 40 para visualizar los fragmentos de amplificación esperados en cada caso).

3.7.1 Análisis de los mutantes en el gen $\Delta FHG1$.

En la Figura 37 se muestran los resultados de las hibridaciones de tipo Southern llevadas a cabo en el análisis de los transformantes 130, 131, 149 y 156 de la estirpe FOP-SP1 y de la propia estirpe FOP-SP1 (Paneles A, B y C), así como de los transformantes 226, 239 y 244 de la estirpe FOP-SP4 y de la propia estirpe FOP-SP4 (Paneles D, E y F), con la sonda específica de la región codificante del alelo silvestre del gen *FHG1* (paneles A y D), con la sonda del Flanco 5' del mismo (Paneles B y E) y con la sonda del gen de resistencia a higromicina (Paneles C y F). El ADN en todos los casos fue digerido con *HindIII*, enzima de restricción para la que existe una diana de reconocimiento dentro de la región codificante de *FHG1* pero fuera de la zona correspondiente al fragmento utilizado como sonda. En el Panel 37A se comprueba que en las cepas transformantes 149 y 156 de FOP-SP1 se detecta la banda de hibridación correspondiente al alelo silvestre de *FHG1*, de 3958 pares de nucleótidos, banda que también se detecta en la cepa FOP-SP1. En las cepas 130 y 131 no se detecta esta banda, lo cual indica que en estos dos transformantes el alelo silvestre ha sido eliminado.

La hibridación con la sonda derivada de la región flanqueante 5' demuestra que, efectivamente, en los transformantes 130 y 131 el alelo silvestre ha sido sustituido por el alelo de reemplazamiento, ya que únicamente se detecta una banda de hibridación, que tiene el tamaño esperado (5374 pares de nucleótidos) del alelo "reemplazamiento". En los transformantes 149 y 156 se detectan ambas bandas con la sonda derivada de la región 5' flanqueante, la correspondiente al alelo silvestre y la correspondiente al alelo reemplazamiento, observación compatible con una integración en tándem, consecuencia de un único evento de recombinación homóloga bien en la región flanqueante 5', bien en la región flanqueante 3', o con la ocurrencia de heterocariosis. La hibridación con la sonda derivada de la región estructural del gen de resistencia a higromicina B (Panel 37C) demuestra que la banda detectada en todos los transformantes con un tamaño de 5374 pares de nucleótidos es, efectivamente, la banda derivada de la copia de reemplazamiento de *FHG1* clonada en el plásmido de transformación. Por lo tanto, sólo los transformantes 130 y 131 de la estirpe FOP-SP1 son auténticos mutantes por reemplazamiento génico del gen *FHG1*. El mismo tipo de análisis llevado a cabo con los transformantes 225, 239 y 244 de la estirpe FOP-SP4 demuestra que en este caso el alelo silvestre *FHG1* ha sido reemplazado por el alelo mutante en todos los transformantes identificados mediante PCR y seleccionados. Para todos los análisis posteriores se seleccionaron dos mutantes

independientes de cada estirpe, los mutantes 130 y 131 de FOP-SP1 y los mutantes 239 y 244 de FOP-SP4.

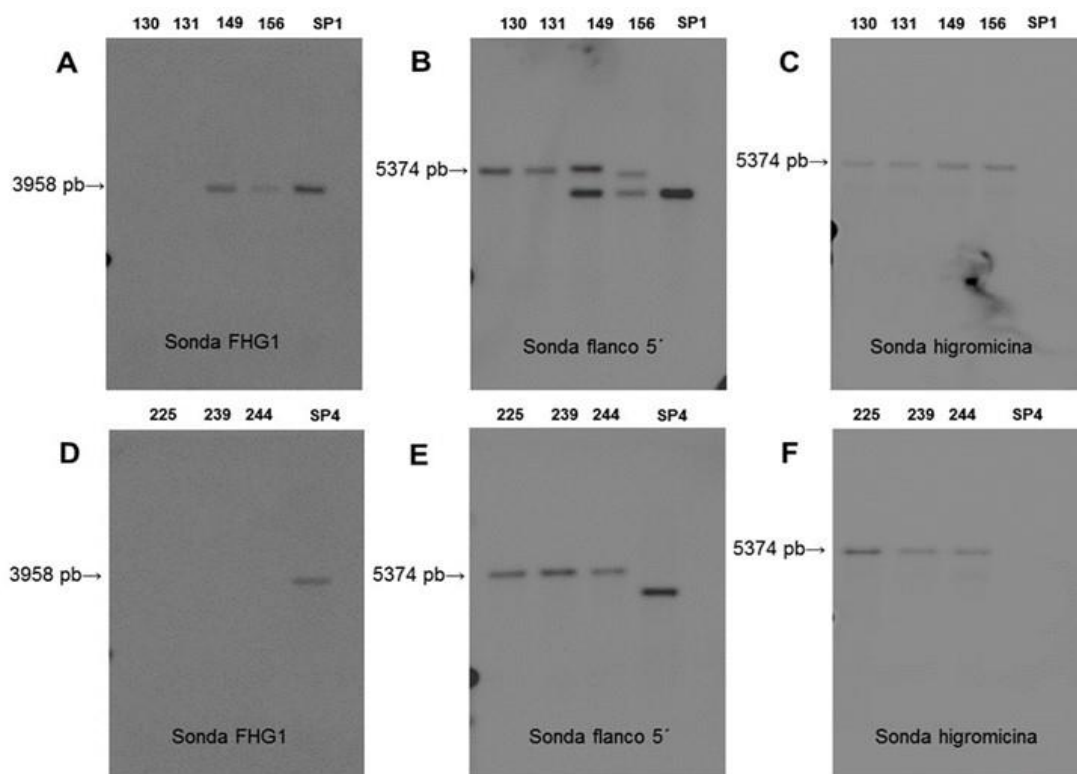


Figura 37. Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes en los que se ha determinado mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen *FHG1* en las estirpes FOP-SP1 (Paneles A, B y C) y FOP-SP4 (Paneles D, E y F). Las muestras de ADN genómico (10 µg en cada caso) fueron digeridas con la enzima de restricción *HindIII*, separadas mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidas a filtros de nylon. Las hibridaciones fueron llevadas a cabo con una sonda derivada de la región estructural del gen *FHG1* (paneles A y D), de su región 5' flanqueante (Paneles B y E) o de la región estructural del gen que confiere resistencia a higromicina B (paneles C y F). Los números sobre los filtros hibridados corresponden a los códigos de los transformantes seleccionados en las transformaciones realizadas sobre la estirpe FOP-SP1 o FOP-SP4, a partir de los cuales se prepararon muestras de ADN genómico que fueron incluidas como control en los filtros correspondientes.

3.7.2 Análisis de los mutantes en el gen $\Delta FHG2$.

En la Figura 38 se muestran los resultados de las hibridaciones llevadas a cabo en el análisis de los transformantes 50, 51, 57 y 61 de la estirpe FOP-SP1 y de la propia estirpe FOP-SP1 (Paneles A, B y C) y de los transformantes 303, 314 y 315 de la estirpe FOP-SP4 y de la propia estirpe FOP-SP4 (Paneles D, E y F) con la sonda específica de la región codificante del alelo silvestre del gen *FHG2* (Paneles A y D), con la sonda derivada de la región flanqueante 5' (Paneles B y E) y con la sonda del gen de resistencia a higromicina

B (Paneles C y F). El ADN en todos los casos fue digerido con *Hind*III, enzima de restricción para la que existe una diana de reconocimiento dentro de la región codificante del gen *FHG2*, pero fuera de la zona correspondiente al fragmento utilizado como sonda. En el Panel 38A se comprueba que en las cepas transformantes 50, 51, 57 y 61 el alelo silvestre ha sido eliminado. La hibridación con la sonda derivada de la región flanqueante 5' demuestra que, efectivamente, en estos transformantes el alelo silvestre ha sido sustituido por el alelo de reemplazamiento, ya que únicamente se detecta una banda, que tiene el tamaño esperado (9084 pares de nucleótidos) del alelo de reemplazamiento. La hibridación con la sonda derivada de la región estructural del gen de la higromicina B (Panel 38C) demuestra que la banda detectada en todos los transformantes con una tamaño de 9084 pares de nucleótidos es, efectivamente, la banda derivada de la copia "reemplazamiento" del gen *FHG2* clonada en el plásmido de transformación.

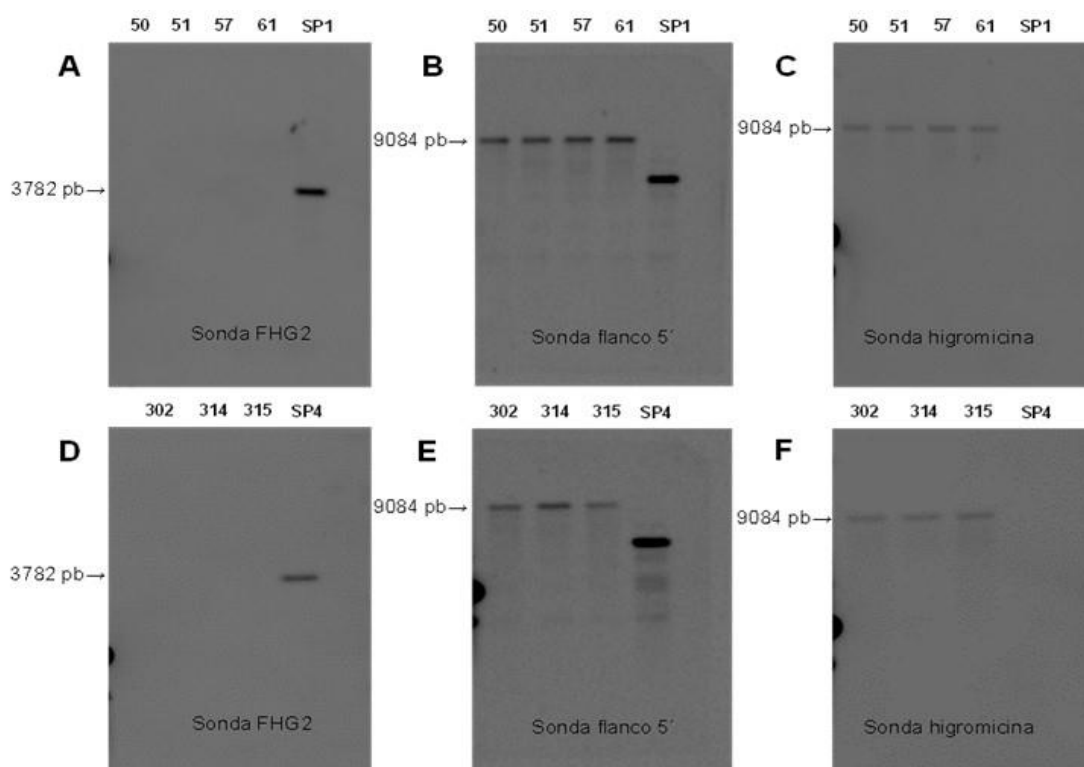


Figura 38. Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes en los que se ha determinado mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen *FHG2* en las estirpes FOP-SP1 (Paneles A, B y C) y FOP-SP4 (Paneles D, E y F). Las muestras de ADN genómico (10 µg en cada caso) fueron digeridas con la enzima de restricción *Hind*III, separados mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidas a filtros de nylon. Las hibridaciones fueron llevadas a cabo con una sonda derivada de la región estructural del gen *FHG2* (Paneles A y D), de su región 5' flanqueante (paneles B y E) o de la región estructural del gen que confiere resistencia a higromicina B (Paneles C y F). Los números sobre los filtros hibridados corresponden a los códigos de los transformantes seleccionados en las transformaciones realizadas sobre la estirpe FOP-SP1 o FOP-SP4, a partir de los cuales se prepararon muestras de ADN genómico que fueron incluidas como control en los filtros correspondientes.

Por lo tanto, los transformantes 50, 51, 57 y 61 de la estirpe FOP-SP1 son auténticos mutantes por remplazamiento génico de *FHG2*. El mismo tipo de análisis llevado a cabo con los transformantes 302, 314 y 315 de la estirpe FOP-SP4 demuestra que en este caso el alelo silvestre *FHG2* ha sido reemplazado por el alelo mutante en todos los transformantes identificados mediante PCR y seleccionados. Para todos los análisis posteriores se seleccionaron dos mutantes independientes de cada estirpe, los mutantes 51 y 61 de FOP-SP1 y los mutantes 314 y 315 de FOP-SP4.

3.7.3 Análisis de los mutantes en el gen Δ *FHG3*.

En la Figura 39 se muestran los resultados de las hibridaciones realizadas con los transformantes 811, 812 y 818 de la estirpe FOP-SP1 y de la propia estirpe FOP-SP1 (Paneles A, B y C) y de los transformantes 705 y 728 de la estirpe FOP-SP4 y de la propia estirpe FOP-SP4 (Paneles D, E y F) con la sonda específica de la región codificante del alelo silvestre del gen *FHG3* (Paneles A y D), con la sonda derivada de la región flanqueante 5' (Paneles B y E) y con la sonda del gen de resistencia a higromicina B (Paneles C y F). El ADN en todos los casos fue digerido con *HindIII*, enzima de restricción para la que existe una diana de reconocimiento dentro de la región codificante del gen *FHG3* pero fuera de la zona correspondiente al fragmento utilizado como sonda. En el Panel 39A se comprueba que en las cepas transformantes 811, 812 y 818 el alelo silvestre ha sido eliminado. La hibridación con la sonda derivada de la región flanqueante 5' demuestra que, efectivamente, en estos transformantes el alelo silvestre ha sido sustituido por el alelo remplazamiento, ya que únicamente se detecta una banda, que tiene el tamaño esperado (6585 pares de nucleótidos). La hibridación con la sonda derivada de la región estructural del gen de resistencia a higromicina B (Panel 39C) demuestra que la banda detectada en todos los transformantes tiene un tamaño de 6585 pares de nucleótidos y es, efectivamente, la banda derivada de la copia de reemplazamiento del gen *FHG3* clonada en el plásmido de transformación. Por lo tanto, los transformantes 811, 812 y 818 de la estirpe FOP-SP1 son auténticos mutantes por remplazamiento génico del gen *FHG3*. El mismo tipo de análisis llevado a cabo con los transformantes 705 y 728 de la estirpe FOP-SP4 demuestra que en este caso el alelo silvestre *FHG3* ha sido reemplazado por el alelo mutante en los dos transformantes identificados mediante PCR y seleccionados. Para todos los análisis posteriores se seleccionaron dos mutantes independientes de cada estirpe, los mutantes 812 y 818 de FOP-SP1 y los mutantes 705 y 728 de FOP-SP4.

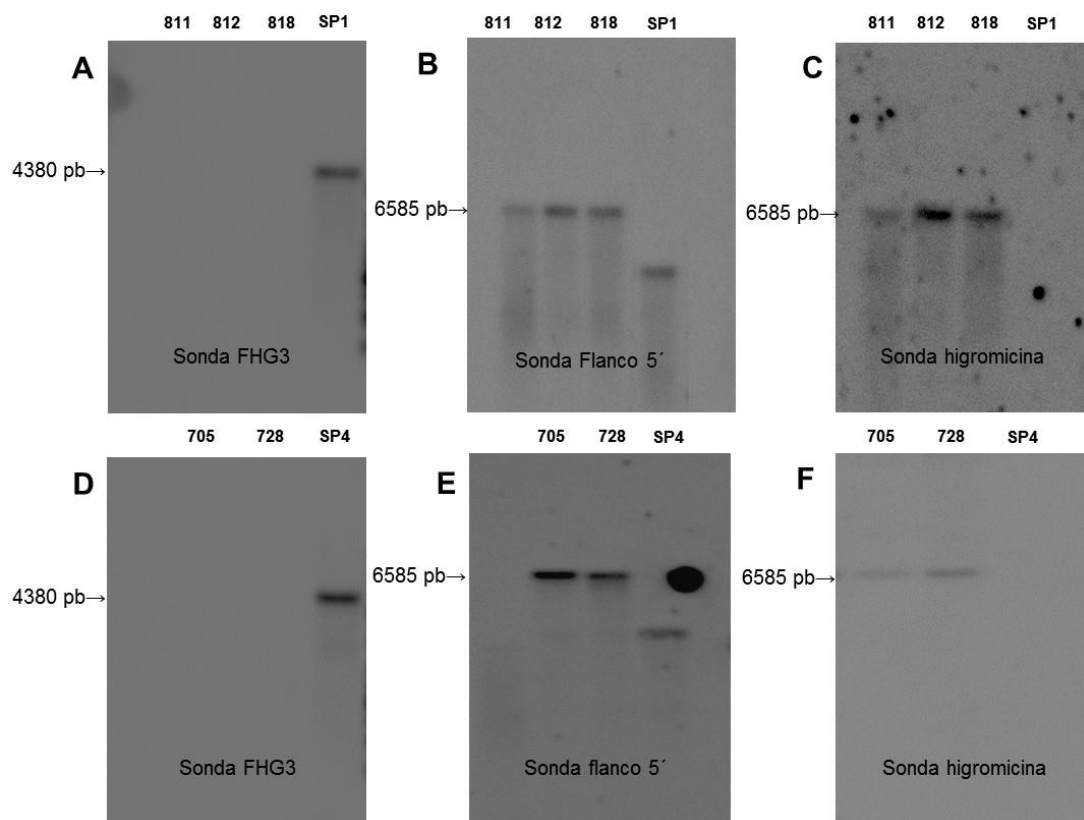


Figura 39. Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes en los que se ha determinado mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen *FHG3* en las estirpes FOP-SP1 (Paneles A, B y C) y FOP-SP4 (Paneles D, E y F). Las muestras de ADN genómico (10 µg en cada caso) fueron digeridas con la enzima de restricción *HindIII*, separados mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidas a filtros de nylon. Las hibridaciones fueron llevadas a cabo con una sonda derivada de la región estructural del gen *FHG3* (Paneles A y D), de su región 5' flanqueante (Paneles B y E) o de la región estructural del gen que confiere resistencia a higromicina B (Paneles C y F). Los números sobre los filtros hibridados corresponden a los códigos de los transformantes seleccionados en las transformaciones realizadas sobre la estirpe FOP-SP1 o FOP-SP4, a partir de los cuales se prepararon muestras de ADN genómico que fueron incluidas como control en los filtros correspondientes.

3.7.4 Análisis de los mutantes en el gen $\Delta FHG4$.

En la Figura 40 se muestran los resultados de las hibridaciones llevadas a cabo en el análisis de los transformantes 619, 637 y 639 de la estirpe FOP-SP1 y de la propia estirpe FOP-SP1 (Paneles A, B y C) y de los transformantes 508 y 516 de la estirpe FOP-SP4 y de la propia estirpe FOP-SP4 (Paneles D, E y F), con la sonda específica de la región codificante del alelo silvestre del gen *FHG4* (Paneles A y D), con la sonda del Flanco 5' (Paneles B y E) y con la sonda del gen de resistencia a higromicina B (Paneles C y F). El ADN en todos los casos fue digerido con *HindIII*, enzima de restricción para la que existe una diana de reconocimiento dentro de la región codificante del gen *FHG4* pero fuera de la

zona correspondiente al fragmento utilizado como sonda. En el Panel 40A se comprueba que en las cepas transformantes 619, 637 y 639 el alelo silvestre ha sido eliminado. La hibridación con la sonda derivada de la región flanqueante 5' demuestra que, efectivamente, en estos transformantes el alelo silvestre ha sido sustituido por el alelo de reemplazamiento, detectándose únicamente una banda que tiene el tamaño esperado (6554 pares de nucleótidos). La hibridación con la sonda derivada de la región estructural del gen de resistencia a higromicina B (Panel 40C) demuestra que la banda detectada en todos los transformantes con un tamaño de 6554 pares de nucleótidos es, efectivamente, la banda derivada de la copia de reemplazamiento del gen *FHG4* clonada en el plásmido de transformación.

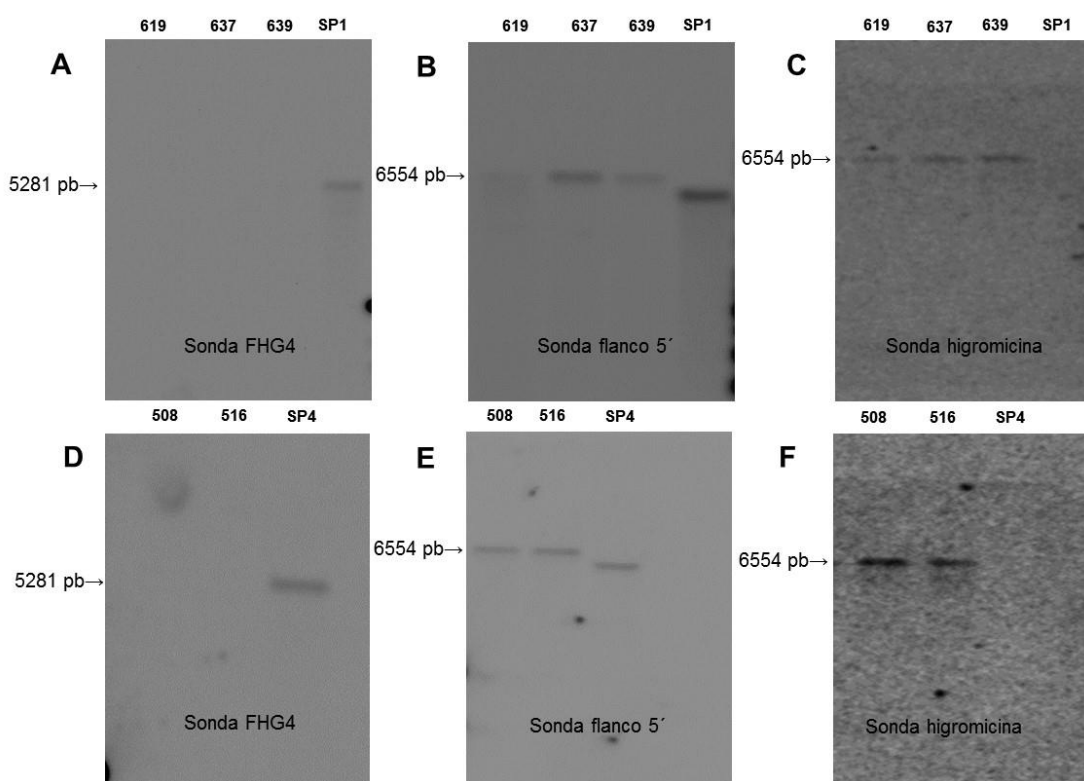


Figura 40. Análisis mediante hibridación tipo Southern de los transformantes en los que se ha determinado mediante PCR la ocurrencia de dos eventos de recombinación homóloga en las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen *FHG4* en las estirpes FOP-SP1 (Paneles A, B y C) y FOP-SP4 (Paneles D, E y F). Las muestras de ADN genómico (10 µg en cada caso) fueron digeridas con la enzima de restricción *HindIII*, separados mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidas a filtros de nylon. Las hibridaciones fueron llevadas a cabo con una sonda derivada de la región estructural del gen *FHG4* (Paneles A y D), de su región 5' flanqueante (Paneles B y E) o de la región estructural del gen que confiere resistencia a higromicina (Paneles C y F). Los números sobre los filtros hibridados corresponden a los códigos de los transformantes seleccionados en las transformaciones realizadas sobre la estirpe FOP-SP1 o FOP-SP4, a partir de los cuales se prepararon muestras de ADN genómico que fueron incluidas como control en los filtros correspondientes.

Por lo tanto, los transformantes 619, 637 y 639 de la estirpe FOP-SP1 son auténticos mutantes por reemplazamiento génico del gen *FHG4*. El mismo tipo de análisis llevado a cabo con los transformantes 508 y 516 de la estirpe FOP-SP4 demuestra que en este caso el alelo silvestre *FHG4* ha sido reemplazado por el alelo mutante en los dos transformantes identificados mediante PCR y seleccionados. Para todos los análisis posteriores se seleccionaron dos mutantes independientes de cada estirpe, los mutantes 619 y 637 de FOP-SP1 y los mutantes 508 y 516 de FOP-SP4.

3.8 Caracterización fisiológica de los mutantes ΔFHG

Los cuatro genes *FHG* analizados en este trabajo codifican proteínas que presentan los dominios funcionales característicos de proteínas tipo flavohemoglobina. Por lo tanto, es posible asumir que estas proteínas están implicadas en la modulación de los niveles de NO a los que puede resultar expuesto *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP). Los cuatro genes muestran patrones de expresión diferentes en respuesta a distintos factores o estímulos, tales como el desarrollo, la fuente de nitrógeno o la exposición a NO exógeno. Estas observaciones sugieren que cada una de estas proteínas puede participar en el mismo proceso fisiológico, respondiendo de manera diferente a un mismo estímulo, o en procesos fisiológicos distintos, quizás en un caso y otro como consecuencia de cierta especialización funcional. Para tratar de identificar los procesos fisiológicos en los que la detoxificación de NO mediada por cada una de estas enzimas pudiera jugar un papel relevante decidimos llevar a cabo una caracterización funcional de los mutantes deficientes en cada uno de los cuatro genes *FHG*. Los aspectos sobre los que decidimos trabajar inicialmente evaluando la ocurrencia de posibles alteraciones en comparación con las estirpes silvestres fueron: (1) la capacidad de crecimiento saprofítico, (2) la sensibilidad frente a condiciones de estrés nitrosativo, (3) la germinación de los microconidios y (4) la agresividad sobre judía.

Para la caracterización fisiológica de las cepas mutantes en cada gen *FHG* en comparación con la correspondiente estirpe silvestre se seleccionaron en cada caso dos cepas mutantes independientes, como hemos indicado anteriormente. El objeto de incluir dos cepas mutantes independientes de cada gen en cada estirpe es comprobar que, en el caso de detectar una variación dada en relación con la cepa silvestre en alguna de las cepas mutantes, ésta es observada también en la segunda cepa mutante alterada en el mismo gen. En una primera aproximación, la consistencia de las observaciones realizadas en ambas cepas mutantes para un gen dado permite adscribir el fenotipo observado a la mutación introducida. La Tabla 22 presenta las cepas mutantes seleccionadas en nuestro

análisis de posibles alteraciones fisiológicas, indicando la cepa tipo silvestre de la que derivan, el gen que ha sido eliminado en cada caso y el código que le ha sido asignado. En todos los análisis llevados a cabo y que se describen a continuación las dos cepas mutantes fueron comparadas con la correspondiente cepa silvestre en experimentos que fueron repetidos al menos en tres ocasiones.

Tabla 22. Estirpes silvestres y cepas mutantes ΔFHG generadas en este trabajo y seleccionadas para su análisis fisiológico.

WT	$\Delta FHG1$	$\Delta FHG2$	$\Delta FHG3$	$\Delta FHG4$
FOP-SP1	$\Delta FHG1$ -130	$\Delta FHG2$ -51	$\Delta FHG3$ -812	$\Delta FHG4$ -619
	$\Delta FHG1$ -131	$\Delta FHG2$ -61	$\Delta FHG3$ -818	$\Delta FHG4$ -637
FOP-SP4	$\Delta FHG1$ -239	$\Delta FHG2$ -314	$\Delta FHG3$ -705	$\Delta FHG4$ -508
	$\Delta FHG1$ -244	$\Delta FHG2$ -315	$\Delta FHG3$ -728	$\Delta FHG4$ -516

3.8.1 Análisis de la capacidad de crecimiento saprofítico y de la sensibilidad a estrés nitrosativo de los mutantes ΔFHG .

En primer lugar se evaluó la capacidad de crecimiento saprofítico de las cepas mutantes en comparación con su correspondiente cepa tipo silvestre en ausencia y en presencia de un donador de NO. La valoración del crecimiento saprofítico en ausencia de donador de NO y, por lo tanto, la presencia de NO exógeno, nos proporcionará, en primer lugar, información sobre posibles alteraciones nutricionales o de desarrollo que pudieran derivarse de la mutación analizada en cada caso y, en segundo lugar, un estado de referencia para evaluar un posible aumento en la sensibilidad frente a condiciones de estrés nitrosativo generadas por la adición de NO exógeno y derivada de la eliminación de una enzima flavohemoglobina dada.

Para el análisis de crecimiento saprofítico y sensibilidad frente a estrés nitrosativo se utilizaron placas de medio de cultivo sólido. El medio de cultivo basal elegido fue medio mínimo suplementado con 1 % glucosa (MMG). Como fuente de nitrógeno se utilizó bien amonio, bien nitrato (ver en la sección 2.2.2.1 de Materiales y Métodos). Las cepas seleccionadas fueron precultivadas en los medios antes mencionados en cada caso y a partir del borde de crecimiento de la colonia se tomaron cilindros de agar con micelio en crecimiento activo de 5 mm de diámetro que fueron transferidos al centro de las placas con

medio de cultivo fresco. En un caso y otro, es decir, en MMG+A o MMG+N, las distintas cepas analizadas fueron cultivadas en ausencia y en presencia del donador de NO (SNP 500 μ M). En cada experimento, para cada cepa (mutante y tipo silvestre) se sembraron tres placas de Petri y el crecimiento fue evaluado estimando el diámetro medio de la colonia en crecimiento a los 2, 3, 4 y 5 días. El ensayo de evaluación de crecimiento en cada condición fue repetido al menos tres veces y los datos registrados fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y la discriminación de medias con el test de Tukey ($p < 0,05$). Las diferencias estadísticas entre cepas de tipo silvestre y las distintas cepas mutantes ΔFHG en ausencia y presencia de NO exógeno se analizaron mediante un análisis pareado con t-test de Student's ($p < 0,05$).

3.8.1.1 Análisis de mutantes ΔFHG de FOP-SP1

La Figura 41 muestra los resultados obtenidos en el análisis de crecimiento saprofítico de los mutantes ΔFHG seleccionados en comparación con la cepa silvestre FOP-SP1. En el Panel 41A los datos presentados son los derivados del cultivo de las distintas cepas en medio suplementado con amonio como fuente de nitrógeno. El Panel 41B presenta los datos obtenidos sobre medio suplementado con nitrato como fuente de nitrógeno. El estudio de estos resultados ofrece varios elementos de información. En primer lugar, en ambos medios de cultivo, MMG+A y MMG+N, y en ausencia de donador de NO, el comportamiento de todas las cepas mutantes consideradas es similar al de la cepa silvestre. El análisis estadístico (ANOVA) demuestra que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en ningún caso entre los valores medios de diámetro de la colonia obtenidos en el caso de las cepas mutantes consideradas y la cepa FOP-SP1. Por lo tanto, la capacidad de crecimiento saprofítico de las cepas mutantes analizadas no se ve alterada de forma significativa como consecuencia de las mutaciones en los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* o *FHG4*.

En segundo lugar, se comprueba que la cepa silvestre FOP-P1 es sensible a las condiciones de estrés nitrosativo que impone la adición de NO (SNP 500 μ M). Tanto en medio con amonio como en medio con nitrato se detectan diferencias significativas ($p < 0,05$, t-test de Student) en el diámetro medio de colonia de la cepa FOP-SP1 en ausencia y en presencia de NO. En medio con amonio la adición del donador de NO determina una reducción del diámetro de la colonia de un 17,3 % y en medio con nitrato una reducción del 12,96 %. Esta reducción de crecimiento ofrece una herramienta de cuantificación de la sensibilidad de FOP-SP1 al NO.

En tercer lugar, las dos cepas mutantes deficientes en el gen $\Delta FHG1$ (130 y 131) y las dos cepas mutantes deficientes en el gen $\Delta FHG2$ (51 y 61) muestran un fenotipo de hipersensibilidad a las condiciones de estrés nitrosativo utilizadas en este trabajo. Tanto en medio con amonio como en medio con nitrato las cepas mutantes indicadas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$, t-test de Student) en el diámetro de la colonia en ausencia y en presencia de NO, presentando una reducción de crecimiento en presencia de NO superior a la observada en las cepas tipo silvestre correspondiente. Se comprueba que la reducción en el diámetro de la colonia observado en presencia de SNP en medio suplementado con amonio es muy superior a la que muestra la propia cepa tipo silvestre FOP-SP1, con una reducción del 36,73 % en el caso de la cepa $\Delta FHG1$ -130, un 40 % en el caso de la cepa $\Delta FHG1$ -131, un 33,33 % en el caso de la cepa $\Delta FHG2$ -51 y un 30,76 % en el caso de la cepa $\Delta FHG2$ -61. Las diferencias en el diámetro de la colonia entre estas cuatro cepas no son significativas, aunque de forma consistente las dos cepas deficientes en el gen $FHG1$ muestra un mayor grado de sensibilidad al donador de NO que las dos cepas deficientes en el gen $FHG2$. En medio suplementado con nitrato también se observa hipersensibilidad a estrés nitrosativo en estas cuatro cepas mutantes, si bien en un grado ligeramente inferior (la reducción en el diámetro de la colonia observado en este caso es de 33,33 % y 30,76 %, para los mutantes $\Delta FHG1$ -130 y $\Delta FHG1$ -131, respectivamente, y de 26,79 % y 23,64 %, para los mutantes $\Delta FHG2$ -51 y $\Delta FHG2$ -61, respectivamente).

Finalmente, las dos cepas mutantes deficientes en el gen $\Delta FHG3$ (812 y 818) y las dos cepas mutantes deficientes en el gen $\Delta FHG4$ (619 y 637) no muestran hipersensibilidad a condiciones de estrés nitrosativo en medio suplementado con amonio, ya que en estas cuatro cepas el diámetro medio de la colonia en presencia de donador de óxido nítrico (NO) no presenta diferencias significativas con el diámetro de la colonia en ausencia de NO (Figura 41A). En presencia de nitrato como fuente de nitrógeno las dos cepas mutantes deficientes en el gen $\Delta FHG3$ y las dos cepas mutantes deficientes en el gen $\Delta FHG4$ tampoco muestran sensibilidad a NO en comparación con las cepas cultivadas en ausencia de NO (Figura 41B). En la Figura 42 se muestran los porcentajes de reducción del diámetro de colonia en presencia de NO (500 μ M de SNP) en los mutantes ΔFHG y en la cepa control SP1 considerando los datos presentados en las Figuras 41A y 41B.

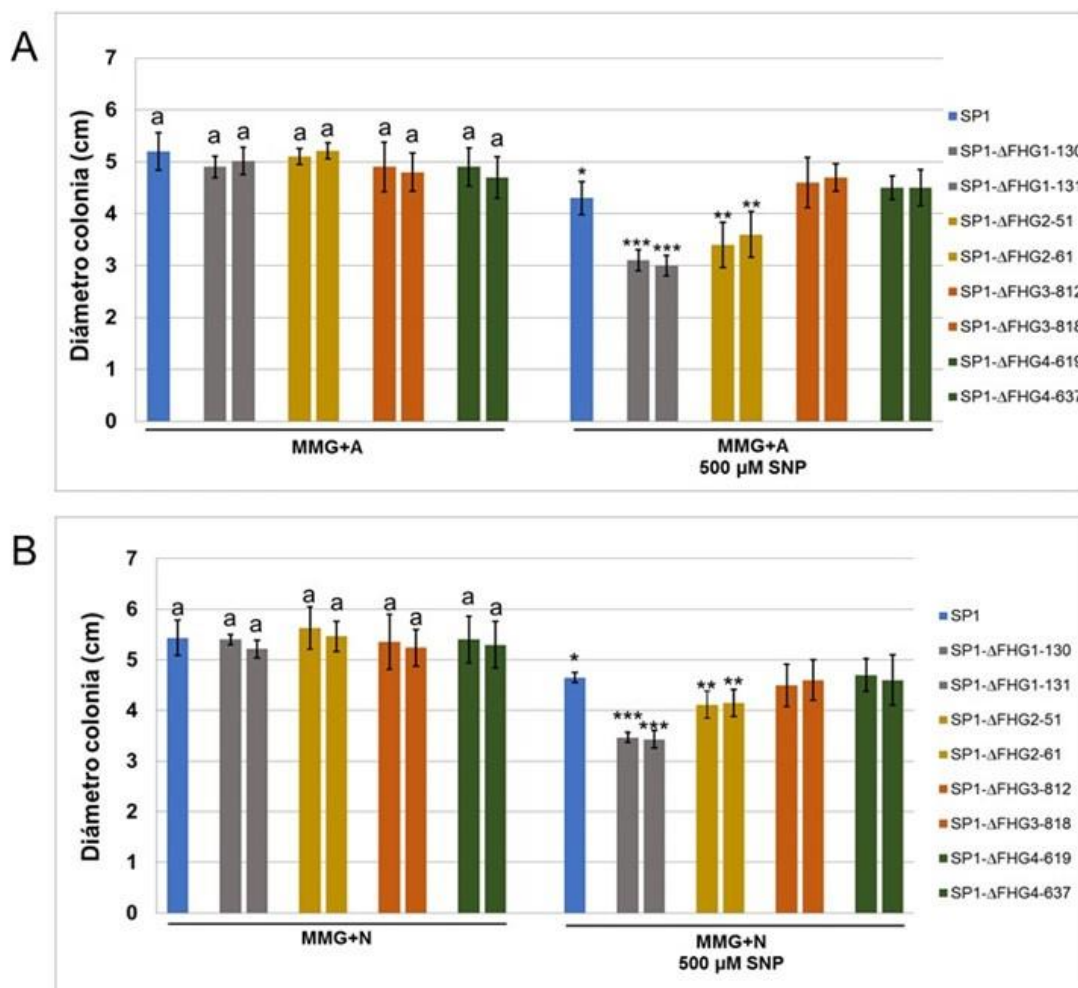


Figura 41. Crecimiento radial de las cepas mutantes en los genes *FHG* de FOP-SP1 y de la cepa control FOP-SP1 evaluados a los 5 días de crecimiento saprofítico. (A) cultivos en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) y MMG+A en presencia de 500 μM de SNP (donador de NO exógeno). (B) cultivos en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) y MMG+N en presencia de 500 μM de SNP (donador de NO exógeno). Los histogramas de la izquierda en los Paneles A y B en medios de cultivo MMG+A y MMG+N en ausencia del donador de NO fueron analizados estadísticamente mediante un análisis ANOVA y la discriminación de medias se realizó con el test de Tukey ($p < 0,05$). En los histogramas de la derecha en los Paneles A y B se muestra el análisis estadístico pareado en cada cepa (tipo silvestre y mutantes) en ausencia y presencia de NO (SNP) con el t-test de Student's ($*p < 0,05$), ($**p < 0,01$), ($***p < 0,001$).

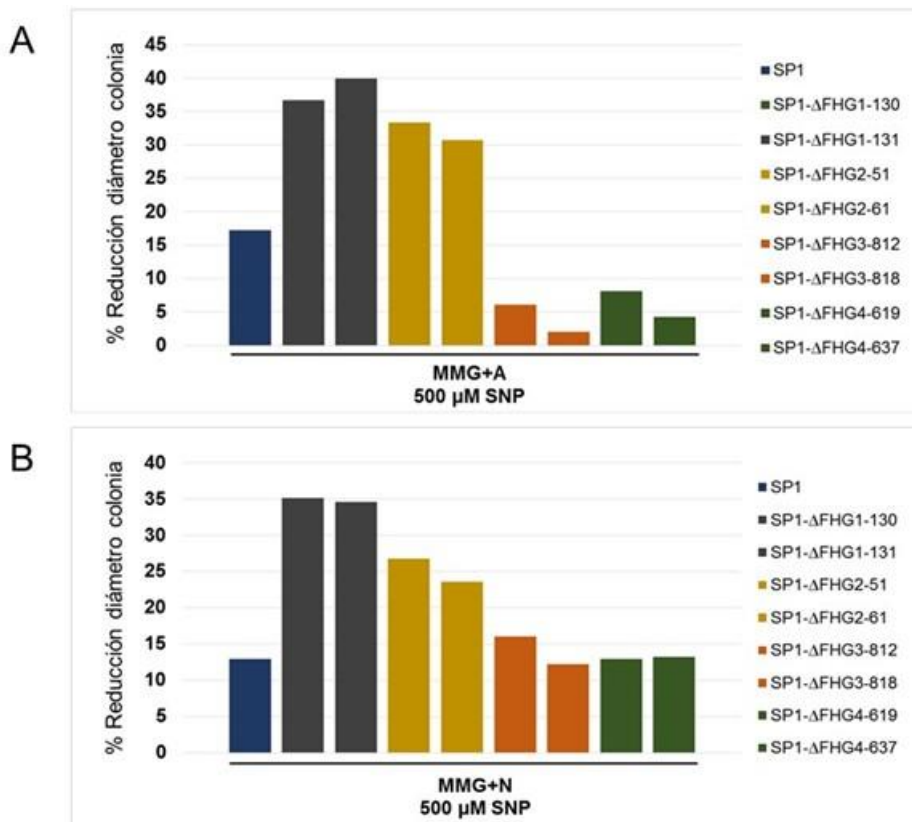


Figura 42. Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia de las cepas mutantes ΔFHG de FOP-SP1 y de la cepa tipo silvestre SP1. Panel A: Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) en presencia de 500 μ M de SNP (donador de NO exógeno). Panel B: Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) en presencia de 500 μ M de SNP (donador de NO exógeno).

3.8.1.2 Análisis de mutantes ΔFHG de FOP-SP4

Se llevó a cabo el mismo tipo de análisis para la caracterización de las cepas mutantes deficientes en los genes *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* o *FHG4* de la cepa FOP-SP4. En la Figura 43 se presentan los resultados obtenidos en estos análisis.

El estudio de la Figura 43A demuestra que la situación en la cepa FOP-SP4 y sus transformantes es muy similar a la descrita en la cepa FOP-SP1 y en sus cepas derivadas. Comprobamos que en cualquiera de las dos fuentes de nitrógeno consideradas, en ausencia de NO exógeno las cepas mutantes no muestran diferencias significativas en su capacidad de crecimiento saprofítico en relación con la cepa tipo silvestre. Comprobamos también que la cepa silvestre FOP-SP4 muestra sensibilidad a NO en los dos medios considerados (con amonio y con nitrato), ya que el diámetro medio de la colonia se reduce significativamente ($p < 0,05$, t-test de Student) en presencia del donador de NO. En este

caso la reducción de crecimiento observada en medio con amonio, de un 15,09 %, es de menor magnitud que en el caso de la cepa FOP-SP1 (17,3 %). En medio con nitrato la reducción de crecimiento determinada en la cepa FOP-SP4, 17,2 %, es superior a la observada para la cepa FOP-SP1 (12,96 %). Por lo tanto, es posible concluir que ambas cepas tipo silvestre son sensibles a NO y en similar medida, mostrando diferencias menores en función de la fuente de nitrógeno en presencia de la cual una y otra son cultivadas.

Comprobamos, además, que las cepas mutantes deficientes en el gen *FHG1* (239 y 244) y las cepas mutantes alteradas en el gen *FHG2* (314 y 315) muestran hipersensibilidad frente a condiciones de estrés nitrosativo. Tanto en amonio como en nitrato como fuente de nitrógeno estas cepas muestran diferencias significativas en el diámetro de la colonia ($p < 0,05$, t-test de Student) en presencia de NO en relación con su comportamiento en ausencia de NO. En comparación con las cepas equivalentes en el fondo genético de FOP-SP1, se observa que el grado de reducción de crecimiento en las cepas mutantes $\Delta FHG1$ y $\Delta FHG2$ es ligeramente menor que en aquellas. Así, en presencia de amonio la reducción de diámetro medio de la colonia en condiciones de estrés nitrosativo es del 32,65 % para la cepa $\Delta FHG1$ -239, y 34,69 % para la cepa $\Delta FHG1$ -244, 20,83 % para la cepa $\Delta FHG2$ -314 y 20,41 % para la cepa $\Delta FHG2$ -315. En presencia de nitrato las reducciones observadas son 31,48 % para $\Delta FHG1$ -239 y 34,54 % para $\Delta FHG1$ -244. Para las cepas $\Delta FHG2$ -314 y $\Delta FHG2$ -315 las reducciones observadas son del 20,75 % y 19,31 %, respectivamente (ver Figura 43A y 43B).

Finalmente, el análisis estadístico demuestra que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$, t-test de Student) en la reducción del diámetro medio de la colonia entre los mutantes de los genes $\Delta FHG3$ y $\Delta FHG4$ en la comparación llevada a cabo en presencia y en ausencia del donador de NO.

En la Figura 44 se muestran los porcentajes medios de reducción del diámetro de colonia en presencia de NO (500 μ M de SNP) en los mutantes ΔFHG de SP4 y en la cepa control SP4 considerando los datos presentados en las Figuras 43A y 43B.

En resumen, del análisis de la capacidad de crecimiento saprofítico y la evaluación de la sensibilidad a condiciones de estrés nitrosativo de las cepas tipo silvestre FOP-SP1 y FOP-SP4 y de los mutantes *FHG* de una y otra se derivan las siguientes conclusiones: (1) Las mutaciones analizadas no afectan a funciones metabólicas básicas relacionadas con la

capacidad de crecimiento saprofítico de las cepas FOP-SP1 y FOP-SP4; (2) FOP-SP1 y FOP-SP4 son sensibles a condiciones de estrés nitrosativo, FOP-SP1 en mayor medida que FOP-SP4; (3) en ambas cepas la función de los genes *FHG1* y *FHG2* está relacionada con la capacidad de las FHG correspondientes para detoxificar NO exógeno; (4) en ambas cepas la función de los genes *FHG3* y *FHG4* no está relacionada con la capacidad de las FHG correspondientes para detoxificar NO exógeno, al menos en las condiciones utilizadas.

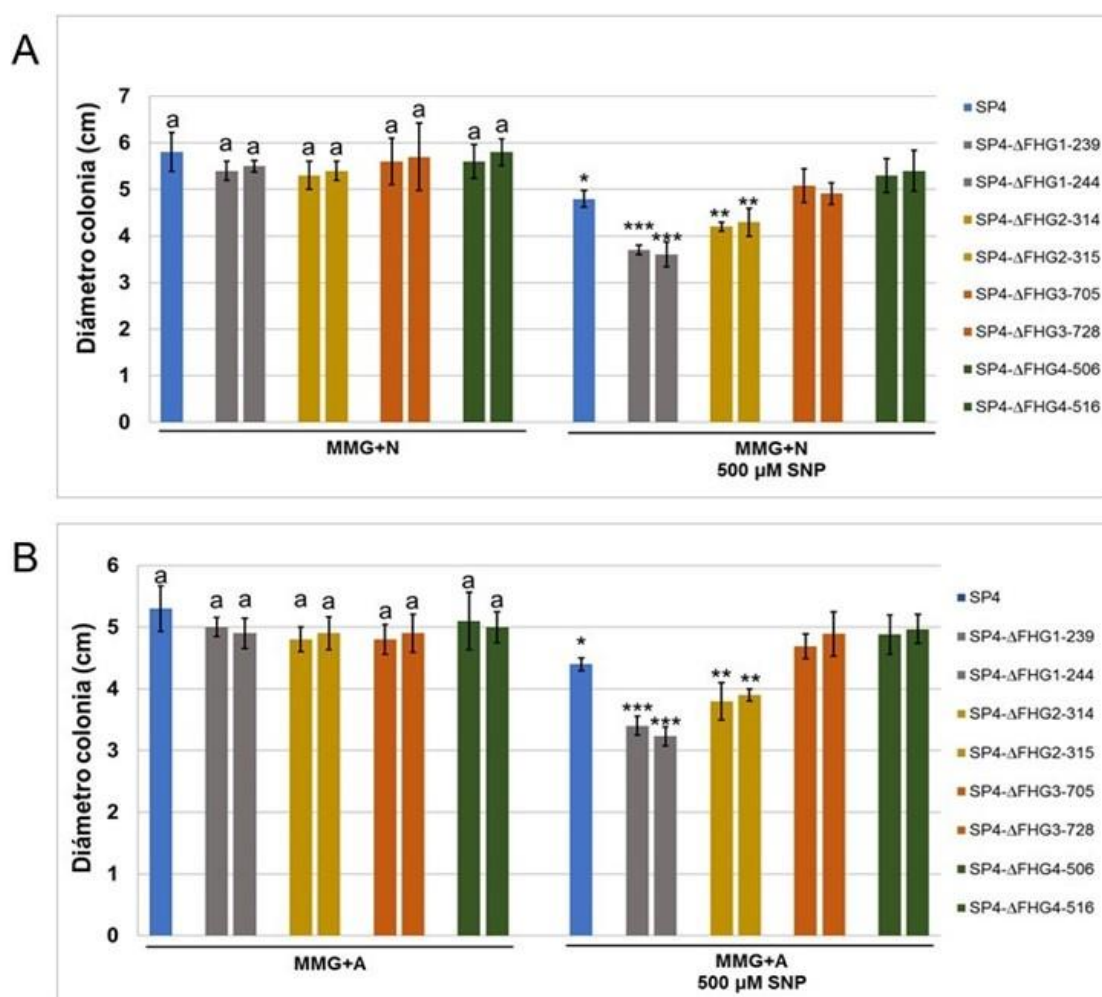


Figura 43. Crecimiento radial de las cepas mutantes en los genes FHG de FOP-SP4 y de la cepa control FOP-SP4 evaluados a los 5 días de crecimiento saprofítico. (A) cultivos en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) y MMG+A en presencia de 500 μM de SNP (donador de NO exógeno). (B) cultivos en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) y MMG+N en presencia de 500 μM de SNP (donador de NO exógeno). Los histogramas de la izquierda en los paneles A y B en medios de cultivo MMG+A y MMG+N en ausencia del donador de NO fueron analizados estadísticamente mediante un análisis ANOVA y la discriminación de medias se realizó con el test de Tukey ($p<0,05$). Los histogramas de la derecha en los Paneles A y B se muestra el análisis estadístico pareado de la cepa de tipo silvestre y de las distintas cepas mutantes en ausencia y presencia de NO (SNP) con el t-test de Student's ($*p<0,05$), ($**p<0,01$), ($***p<0,001$).

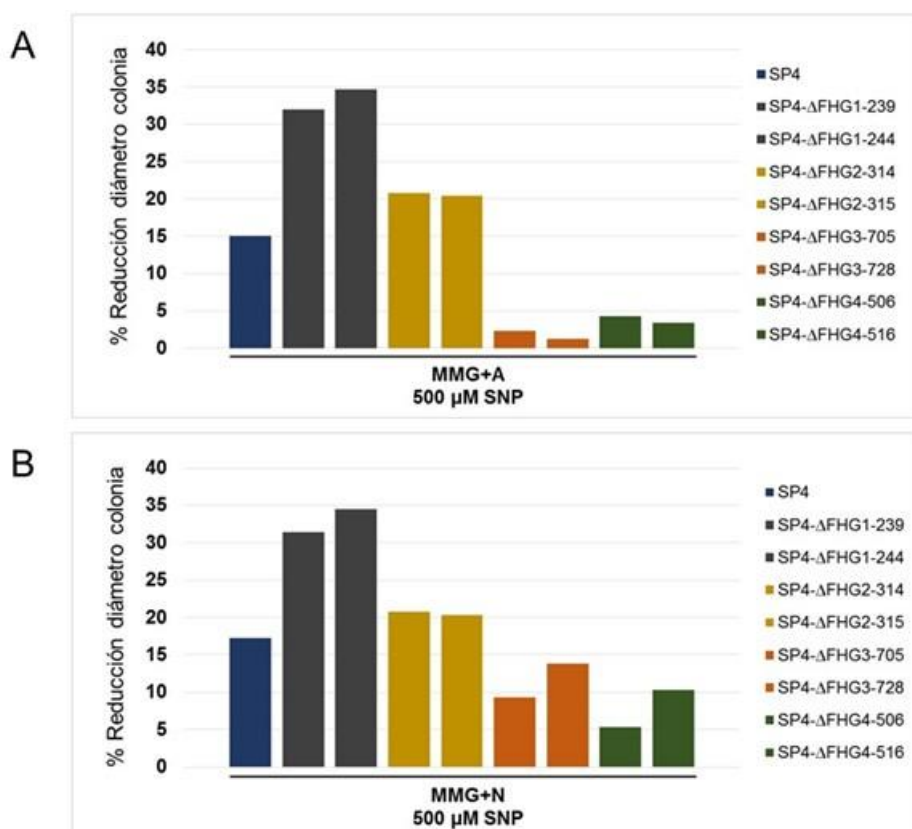


Figura 44. Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia de las cepas mutantes ΔFHG de FOP-SP4. Panel A: Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) en presencia de 500 μM de SNP (donador de NO exógeno). Panel B: Porcentajes de reducción del diámetro de la colonia en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) en presencia de 500 μM de SNP (donador de NO exógeno).

3.8.2 Análisis de germinación de microconidios de mutantes ΔFHG

A continuación nos propusimos evaluar los efectos que pudiera tener el NO exógeno sobre la germinación de microconidios en las cepas silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4 y en las cepas mutantes en los genes *FHG* de cada una de ellas. Con este objeto se diseñó una aproximación experimental que permitiera cuantificar la germinación de microconidios a lo largo del tiempo en las cepas consideradas, evaluando el efecto de la fuente de nitrógeno (amonio o nitrato) y de la presencia o no de NO en el medio de cultivo mínimo líquido.

En este estudio se incluyeron las mismas cepas analizadas en la sección anterior en relación con la capacidad de crecimiento saprofítico en medio sólido. Las dos estirpes tipo silvestre, FOP-SP1 y FOP-SP4, y las dos cepas mutantes independientes en cada gen *FHG* fueron cultivados en medio líquido tal y como se describe en la sección 2.2.2.2 de

Materiales y Métodos. El medio mínimo fue suplementado con tartrato de amonio (10 mM) o con nitrato de sodio (10 mM) en presencia y en ausencia de donador de NO. En estos experimentos se utilizó como donador de óxido nítrico DETA (250 μ M) en lugar de nitroprusiato sódico (SNP). DETA-NO dentro del grupo de los donadores de NO es el de mejor calidad y pureza, libera NO de forma lenta pero continua durante más tiempo, a diferencia del donador de NO nitroprusiato sódico (SNP) que libera elevadas cantidades de NO y durante periodos cortos de tiempo, y no provoca efectos secundarios dañinos para la célula, en medio acuoso produce ion cianuro y posteriormente tiocianato que son compuestos altamente tóxicos para la supervivencia de la célula (Moncada *et al.*, 1991; Perazzolli *et al.*, 2004). La germinación de los microconidios se evaluó a las 4, 6, 8, 10 y 12 horas. En cada momento considerado se llevaron a cabo los recuentos considerando como microconidios germinados aquéllos que presentaron un tubo germinativo con una longitud igual o superior al tamaño del microconidio no germinado. Se realizaron tres réplicas con diferentes muestras biológicas tanto de las cepas mutantes como de las cepas silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4. Los datos generados fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y la discriminación de medias se realizó con el test de Tukey ($p < 0,05$). Las diferencias estadísticas en las cepas tipo silvestre y en las distintas cepas mutantes en ausencia y en presencia de NO exógeno se realizó llevando a cabo un análisis pareado con el t-test de Student's ($p < 0,05$).

3.8.2.1 Análisis de germinación de microconidios de mutantes ΔFHG de FOP-SP1

La Figura 45 muestra los resultados obtenidos en el análisis de la germinación de microconidios de los mutantes SP1- ΔFHG seleccionados en comparación con la cepa silvestre FOP-SP1 a las 10 horas de cultivo. En el Panel A se presentan los datos de la germinación en medios de cultivo con amonio como única fuente de nitrógeno en ausencia y presencia de NO (DETA 250 μ M). En el Panel B se presentan los datos derivados del mismo análisis llevado a cabo en medios de cultivo suplementados con nitrato como fuente de nitrógeno. En ambos medios de cultivo, MMG+A y MMG+N, en ausencia del donador de NO (DETA) el comportamiento de todas las cepas mutantes consideradas es similar al de la cepa silvestre y el análisis estadístico demuestra que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la germinación de microconidios entre las cepas mutantes $\Delta FHG1$, $\Delta FHG2$, $\Delta FHG3$ o $\Delta FHG4$ y la cepa FOP-SP1. Por lo tanto, la eficiencia de la germinación de las cepas mutantes analizadas no se ve alterada de forma significativa

como consecuencia de las mutaciones inducidas en estos genes en ausencia de NO exógeno.

En la cepa silvestre FOP-SP1 la eficiencia de la germinación de microconidios es afectada significativamente ($p < 0,05$, T-test de Student) por la presencia de NO (DETA 250 μ M) tanto en medio con amonio como en medio con nitrato, en comparación con los cultivos en ausencia del donador de NO. En medio con amonio la adición del donador de NO determina un retraso en la germinación del 19,40 % y en medio con nitrato un retraso del 25,01 %.

En cuanto al comportamiento de los mutantes deficientes en el gen $\Delta FHG1$ (130 y 131) se observa que en presencia de NO estos mutantes muestran diferencia significativas ($p < 0,05$, T-test de Student) en medio con amonio en relación con la situación “ausencia de NO exógeno”, con una reducción en la eficiencia de germinación muy superior a la que muestra la cepa tipo silvestre FOP-SP1 (83,59 % de reducción en el caso de la cepa $\Delta FHG1$ -130 y un 85,67 % en el caso de la cepa $\Delta FHG1$ -131 (Panel 45A). En este medio los mutantes $\Delta FHG2$, $\Delta FHG3$ y $\Delta FHG4$, también muestran un retraso en la germinación en relación con la situación observada en ausencia de NO, pero este retraso tiene la misma magnitud que el observado en la cepa silvestre (el análisis estadístico agrupa estas seis cepas mutantes con la cepa silvestre). Esto supone que el NO afecta a la germinación en FOP-SP1, determinando un retraso de la misma, y que probablemente la flavohemoglobina codificada por $FHG1$ juega un papel fundamental en la eliminación del NO que retrasa la germinación. Las flavohemoglobinas codificadas por los genes $FHG2$, $FHG3$ y $FHG4$ no tienen un papel importante en la eliminación del NO que afecta a la germinación.

En medio con nitrato la situación que se observa cuando se añade el donador de NO es similar a la descrita en medio con amonio, pero con algunas diferencias importantes. En este caso en general el efecto de la adición de NO es más evidente (la reducción en el porcentaje de germinación en las distintas cepas analizadas es mayor). Las cepas que manifiestan una mayor reducción, como en el caso anterior, son las cepas mutantes deficientes en el gen $FHG1$ y las que muestran una menor reducción son las cepas deficientes en el gen $FHG3$ y las cepas deficientes en el gen $FHG4$ (que se comportan como la cepa silvestre FOP-SP1). Las cepas deficientes en el gen $FHG2$ muestran un comportamiento particular en este medio de cultivo, mostrando diferencias significativas en la condición “presencia de NO” en relación con la condición “ausencia de NO”, con una reducción intermedia en el porcentaje de germinación con valores intermedios entre las correspondientes cepas $\Delta FHG1$ y las correspondientes a los de las las cepas $\Delta FHG3$ y

$\Delta FHG4$ (que son iguales al de la cepa silvestre). De hecho, el análisis estadístico detecta la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$, T-test de Student) entre medias en el conjunto de cepas analizadas y genera un grupo particular que incluye a estas dos cepas mutantes, $\Delta FHG2-51$ y $\Delta FHG2-61$, diferentes a los otros dos grupos, con una reducción de la germinación del 59,80 % para $\Delta FHG2-51$ y para $\Delta FHG2-61$ una reducción del 60,76%.

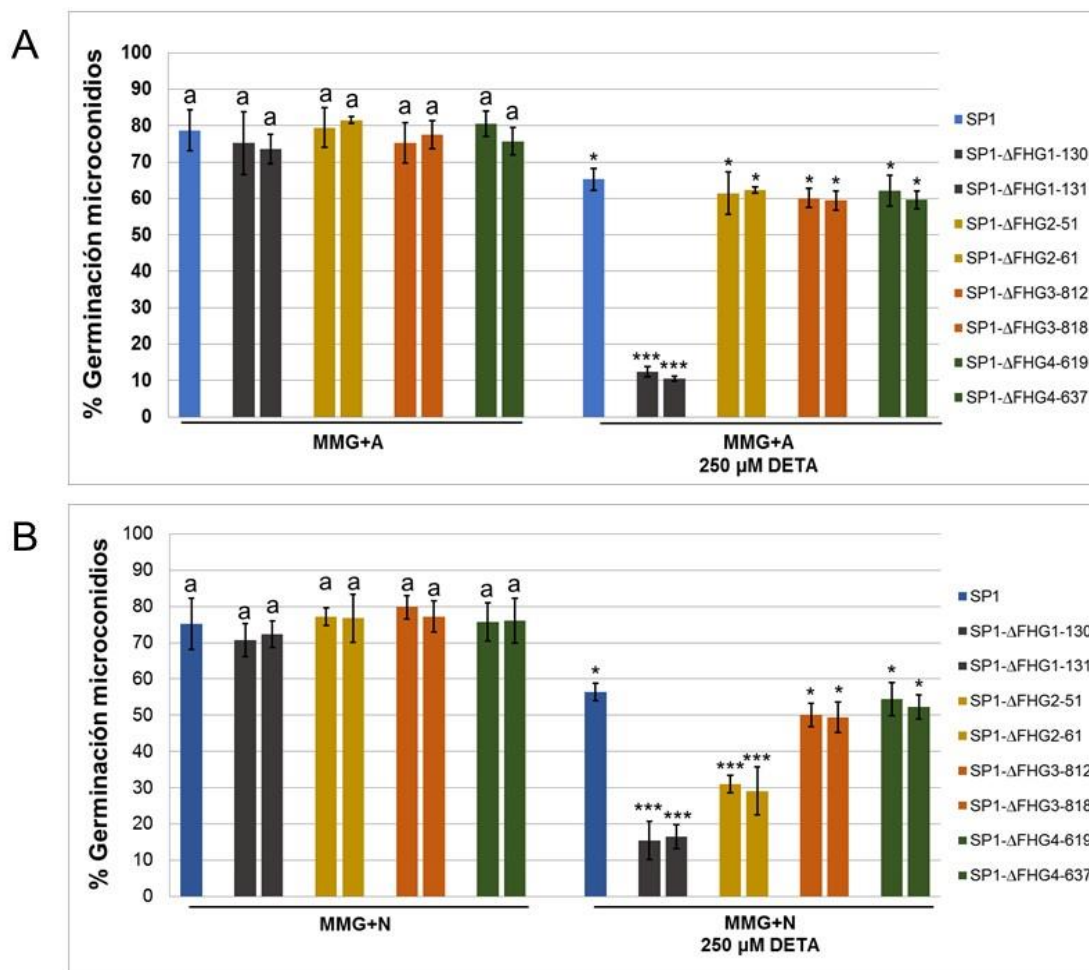


Figura 45. Efecto del NO en la germinación de microconidios de los mutantes de los genes *FHG* de FOP-SP1 y de la propia cepa silvestre FOP-SP1, evaluadas a las 10 horas de cultivo. (A) cultivos en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) y MMG+A en presencia de 250 μ M DETA. (B) cultivos en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) y MMG+N en presencia de 250 μ M DETA. Los histogramas de la izquierda en los Paneles A y B en medios de cultivo MMG+A y MMG+N en ausencia del donador de NO fueron analizados estadísticamente mediante un análisis ANOVA y la discriminación de medias se realizó con el test de Tukey ($p < 0,05$). En los histogramas de la derecha en los Paneles A y B se muestra el análisis estadístico pareado en la cepa de tipo silvestre y en las distintas cepas mutantes en ausencia y presencia de NO (DETA) con el t-test de Student (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

En la Figura 46 se muestran los porcentajes de reducción de la germinación de microconidios en los mutantes de los genes *FHG*, en presencia de 250 μ M de DETA en relación con las cepas control en ausencia del donador de NO. Los porcentajes mostrados confirman que, efectivamente, el NO afecta a la germinación y que la flavohemoglobina FHG1 es la enzima detoxificadora de NO que juega un papel más importantes en la eliminación del NO que afecta a la germinación, pero en función de la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo la flavohemoglobina FHG2 también participa en esta detoxificación: no lo hace en presencia de amonio pero sí en presencia de nitrato.

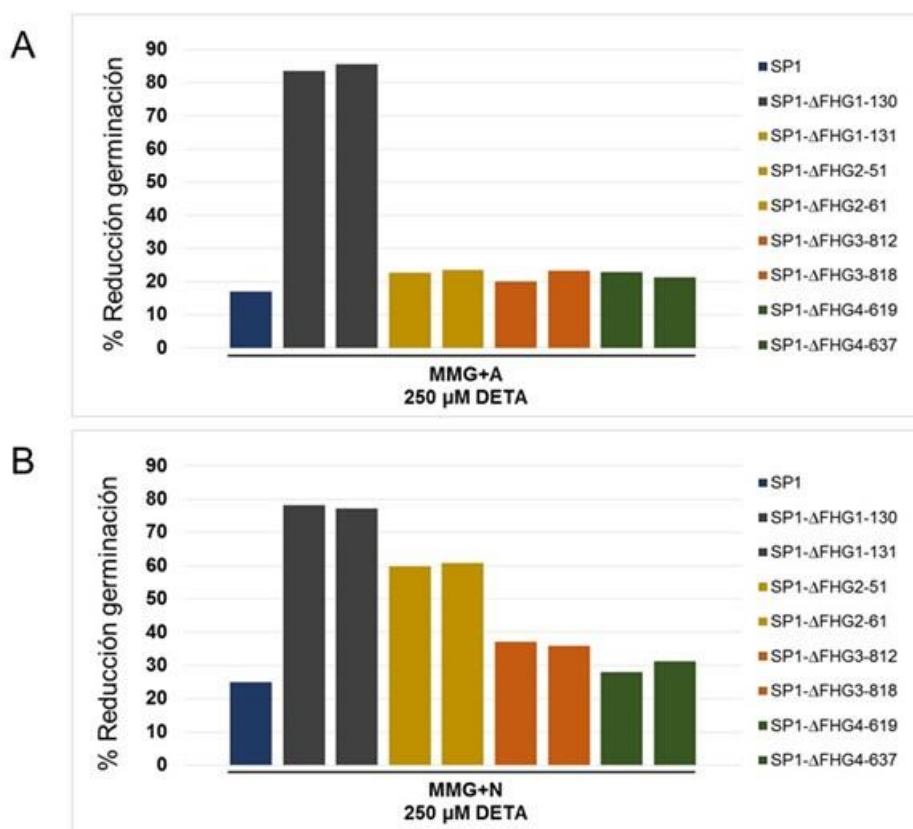


Figura 46. Porcentajes de reducción de la germinación de microconidios de las cepas mutantes Δ *FHG* de FOP-SP1. Panel A: Porcentajes de reducción de germinación en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) en presencia de 250 μ M DETA. Panel B: Porcentajes de reducción de germinación en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) en presencia de 250 μ M DETA.

3.8.2.2 Análisis de germinación de microconidios de mutantes Δ *FHG* de FOP-SP4

En la Figura 47 se presentan los datos de germinación en la cepa FOP-SP4 y en los transformantes derivados de ésta en medio suplementado con amonio (Panel A) y en medio suplementado con nitrato (Panel B). El análisis estadístico ANOVA muestra que,

tanto en presencia de amonio como de nitrato como única fuente de nitrógeno, en ausencia de NO exógeno las cepas mutantes no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) en su eficiencia de germinación en relación con la cepa tipo silvestre. La adición de NO al medio de cultivo determina una reducción importante en el porcentaje de germinación observado en la cepa silvestre en ambos medios de cultivo (diferencias significativas en ambos casos $p < 0,05$, t-test de Student), reducción que es superior a la observada en el caso de la cepa FOP-SP1 en las mismas condiciones (en medio con amonio es de un 34,88 % y en medio con nitrato es del 36,51 %). Por lo tanto, es posible deducir que la cepa FOP-SP4 es más sensible a NO en relación con el efecto que éste tiene sobre germinación que la cepa FOP-SP1, tanto en medio con amonio como en medio con nitrato.

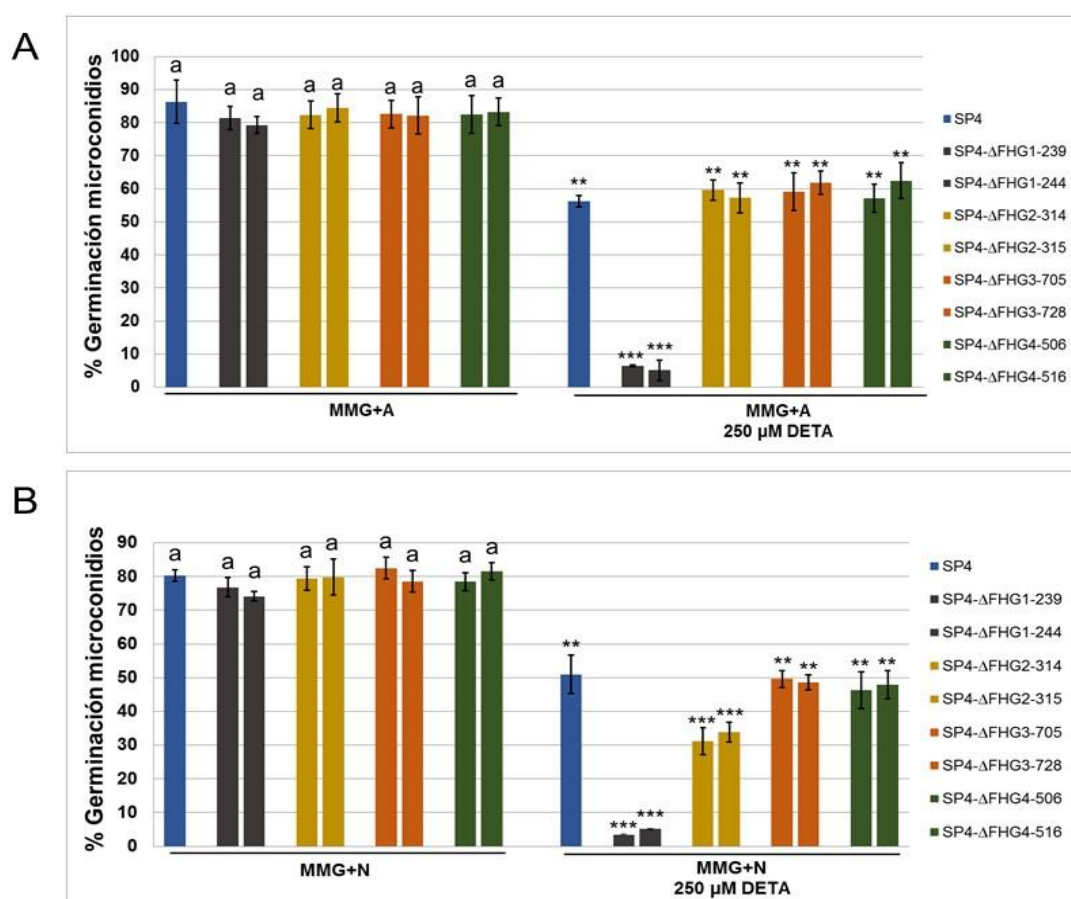


Figura 47. Efecto del NO en la germinación de microconidios de los mutantes de los genes *FHG* de FOP-SP4 y de la propia cepa silvestre FOP-SP4, evaluadas a las 10 horas de cultivo. (A) Cultivos en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) y MMG+A en presencia de 250 µM DETA. (B) Cultivos en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) y MMG+N en presencia de 250 µM DETA. Los histogramas de la izquierda en los Paneles A y B en medios de cultivo MMG+A y MMG+N en ausencia del donador de NO fueron analizados estadísticamente mediante un análisis ANOVA y la discriminación de medias se realizó con el test de Tukey ($p < 0,05$). En los histogramas de la derecha de los Paneles A y B se muestra el análisis estadístico pareado en la cepa de tipo silvestre y en las distintas cepas mutantes en ausencia y presencia de NO (DETA) con el t-test de Student (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Establecida esta diferencia de sensibilidad de la cepa FOP-SP4 en comparación con la cepa FOP-SP1, el análisis global de los datos generados en la situación “presencia de NO” demuestra que el comportamiento de las correspondientes cepas mutantes deficientes en cada uno de los cuatro genes *FHG* en la cepa FOP-SP4 es el mismo que el observado en el caso de los mutantes en la cepa FOP-SP1. Así, en medio con amonio es la flavohemoglobina codificada por *FHG1* la enzima que probablemente es la responsable de la detoxificación del NO que afecta a la germinación. En medio con nitrato, además de *FHG1*, la flavohemoglobina codificada por el gen *FHG2* parece tener un papel relevante en la detoxificación de NO.

En la Figura 48, se presenta un resumen de los porcentajes de reducción de la germinación de microconidios de las distintas cepas mutantes en los genes *FHG* derivados de la cepa FOP-SP4 de la que se derivan los respectivos mutantes, en medios de cultivo con amonio y nitrato en ausencia y en presencia de 250 μ M DETA y mostrados en las Figuras 47A y 47B.

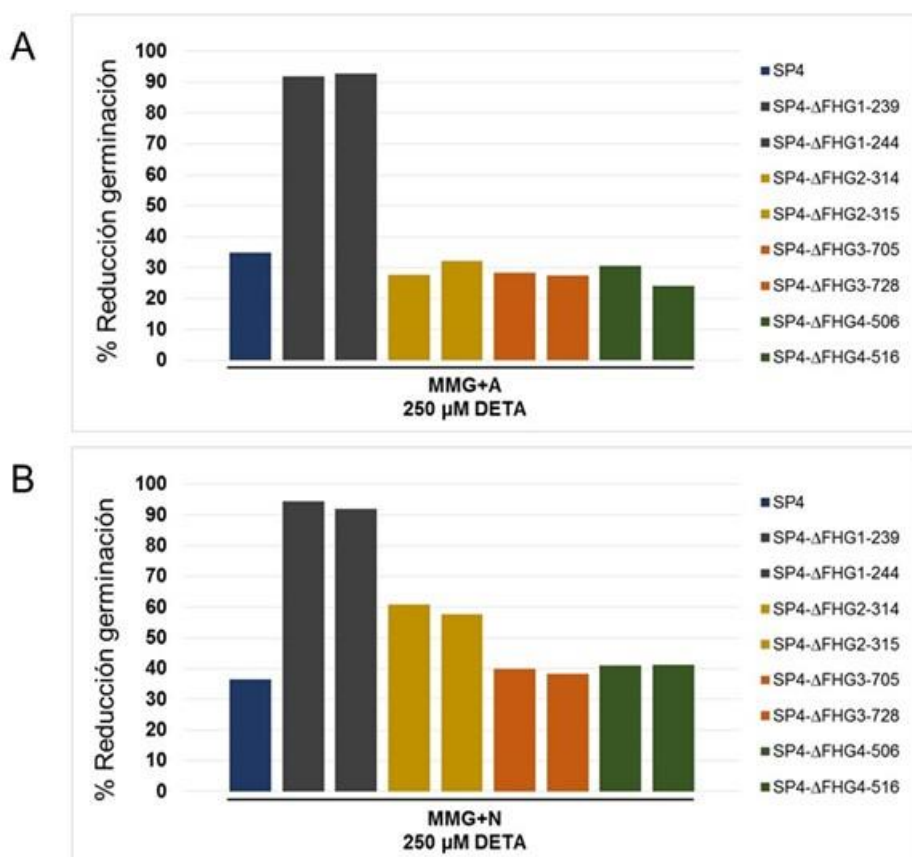


Figura 48. Porcentajes de reducción de la germinación de microconidios de las cepas mutantes Δ *FHG* de FOP-SP4. Panel A: Porcentajes de reducción de germinación en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato de amonio (MMG+A) en presencia de 250 μ M DETA. Panel B: Porcentajes de reducción de germinación en medio mínimo con 1 % de glucosa, suplementado con 10 mM de nitrato de sodio (MMG+N) en presencia de 250 μ M DETA.

3.8.3 Ensayos de infección *in planta* con los mutantes ΔFHG .

Los trabajos descritos en las secciones anteriores indican que las FHG codificadas por al menos dos de los genes analizados, *FHG1* y *FHG2*, desempeñan una función relevante en la detoxificación de NO exógeno y en la resistencia a condiciones de estrés nitrosativo. Además, el análisis de la eficiencia y dinámica de germinación de las cepas mutantes correspondientes demuestra que el NO tiene un efecto notable sobre la germinación de los microconidios, y que este efecto parece estar modulado por las enzimas de tipo flavohemoglobina codificadas por estos dos genes. Teniendo en cuenta que el NO es producido por la planta durante la interacción con distintos tipos de patógenos y que su función como molécula señalizadora y ejecutora que coordina y orquesta la respuesta defensiva de la planta es esencial (Arasimowicz-Jelonek & Floryszak-Wieczorek, 2014), decidimos evaluar la agresividad de los mutantes ΔFHG de FOP-SP1 y FOP-SP4 durante las interacciones que una y otra cepa establecen con el huésped. Para ello diseñamos una serie de ensayos de infección de plantas de judía variedad “blanca riñón” que fueron llevados a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.5.1 de Materiales y Métodos.

En cada ensayo de infección se inocularon 10 plantas de judía con cada estirpe silvestre considerada, FOP-SP1 y FOP-SP4, y 10 plantas con cada una de las cepas mutantes seleccionadas (las mismas cepas mutantes analizadas en las secciones anteriores (Tabla 23). Los síntomas y el progreso de la enfermedad fueron evaluados en las plantas inoculadas con las cepas mutantes y comparadas con los síntomas y el progreso de la enfermedad en las plantas inoculadas con las estirpes silvestres de las que derivan los mutantes. El ensayo con cada estirpe fue repetido 3 veces en plantas infectadas con diferentes lotes de microconidios. El progreso de la enfermedad fue evaluado semanalmente utilizando la escala CIAT, en la cual las plantas que muestran un índice de 1 a 3 son consideradas como resistentes al patógeno mientras que las plantas con un índice en la escala de 3,1 a 9 son consideradas como susceptibles al patógeno.

Tabla 23. Valores de infección en plantas de judía variedad “Blanca Riñón” inoculadas con las cepas indicadas, estimados según la escala CIAT. En la primera columna se muestran los códigos de las cepas tipo silvestre (FOP-SP1 y FOP-SP4) y de las cepas mutantes utilizadas. En las columnas 2 a 6 se representa el valor medio de la escala CIAT de todas las plantas para el aislado considerado en la semana indicada (\pm DE). Control: inoculaciones llevadas a cabo con agua.

SEMANAS					
SEMANAS	1	2	3	4	5
SP1	1 \pm 0.0	5,6 \pm 0.4	7 \pm 0.5	8,7 \pm 0.2	9 \pm 0.0
SP1- Δ FHG1-130	1 \pm 0.0	5,5 \pm 1.2	7,1 \pm 1.1	8,7 \pm 0.9	9 \pm 0.0
SP1- Δ FHG1-131	1 \pm 0.0	5,5 \pm 0.7	7,2 \pm 1.3	8,5 \pm 1.2	8,9 \pm 2.1
SP1- Δ FHG2-51	1 \pm 0.0	6 \pm 0.5	7,2 \pm 0.7	8,6 \pm 1.2	8,7 \pm 2.0
SP1- Δ FHG2-61	1 \pm 0.0	5 \pm 0.6	7,5 \pm 0.8	8,8 \pm 0.6	8,6 \pm 1.9
SP1- Δ FHG3-812	1 \pm 0.0	5,5 \pm 0.5	7,2 \pm 1.2	8,5 \pm 1.2	8,7 \pm 0.9
SP1- Δ FHG3-818	1 \pm 0.0	5 \pm 0.6	6,9 \pm 0.4	8,6 \pm 0.3	8,7 \pm 0.8
SP1- Δ FHG4-619	1 \pm 0.0	5,3 \pm 0.2	7 \pm 0.3	8,8 \pm 0.4	8,8 \pm 0.8
SP1- Δ FHG4-637	1 \pm 0.0	5 \pm 1.2	7,2 \pm 0.2	8,7 \pm 0.4	8,7 \pm 2.0
SP4	1 \pm 0.0	2,3 \pm 0.5	4 \pm 0.3	5,4 \pm 0.2	4,9 \pm 0.1
SP4- Δ FHG1-239	1 \pm 0.0	2,1 \pm 1.0	3,2 \pm 0.5	5,1 \pm 0.5	4,6 \pm 0.3
SP4- Δ FHG1-244	1 \pm 0.0	2,3 \pm 0.7	3,1 \pm 0.6	5,3 \pm 0.4	5 \pm 0.2
SP4- Δ FHG2-314	1 \pm 0.0	3 \pm 0.2	3,6 \pm 0.8	4,9 \pm 0.3	5 \pm 0.5
SP4- Δ FHG2-315	1 \pm 0.0	2,8 \pm 1.0	3,5 \pm 0.2	4,5 \pm 1.3	5 \pm 1.1
SP4- Δ FHG3-705	1 \pm 0.0	2,2 \pm 0.2	3,3 \pm 0.2	5 \pm 0.4	4 \pm 0.3
SP4- Δ FHG3-728	1 \pm 0.0	2,5 \pm 0.1	3,4 \pm 0.4	4,7 \pm 0.3	5 \pm 1.2
SP4- Δ FHG4-508	1 \pm 0.0	2,4 \pm 0.3	3 \pm 0.5	4,9 \pm 0.4	4,8 \pm 0.5
SP4- Δ FHG4-516	1 \pm 0.0	2,3 \pm 0.3	3,9 \pm 0.4	5,2 \pm 0.4	4 \pm 0.5

Los resultados de infección mostrados en la Tabla 23 y en la Figura 49 indican que los mutantes Δ FHG de FOP-SP1 y de FOP-SP4 no muestran diferencias significativas en su capacidad de infección de la planta huésped en comparación con la cepa silvestre correspondiente.

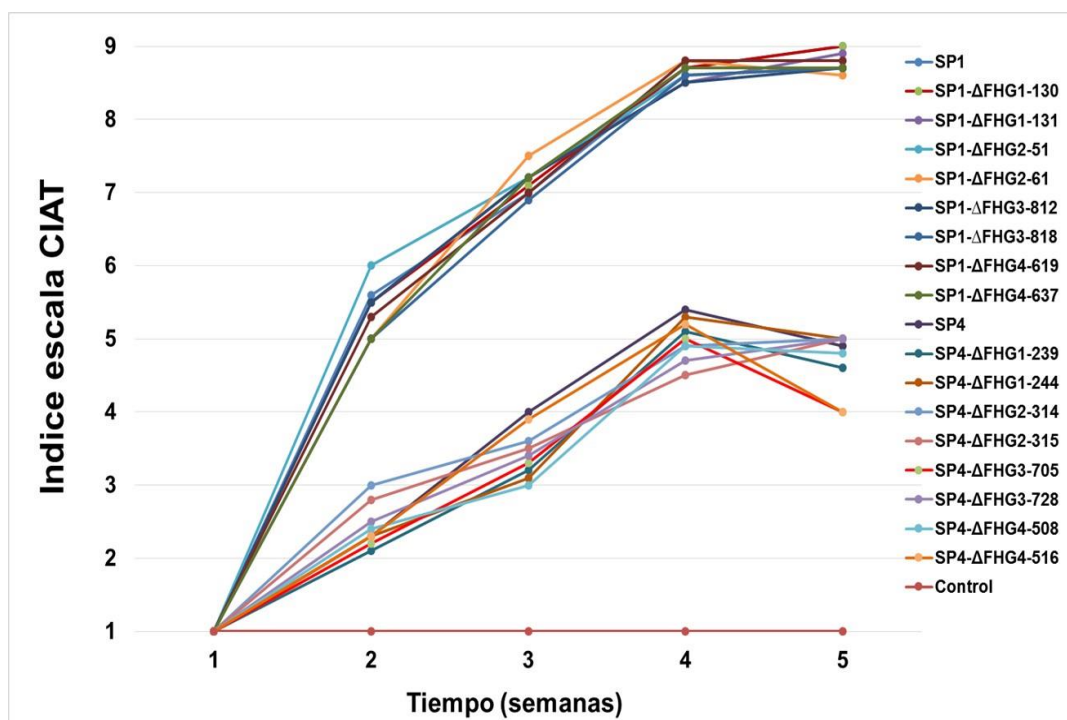


Figura 49. Evaluación de la agresividad de los mutantes ΔFHG de FOP-SP1 y FOP-SP4 (ver leyenda) sobre la variedad de judía Blanca Riñón. Como control negativo se utilizaron plantas no infectadas. Se utilizó la escala CIAT (1=planta sana a 9=planta totalmente afectada o muerta) para medir la severidad de los síntomas.

3.9 Ensayos de complementación de la mutación $\Delta FHG1$

Los análisis de expresión llevados a cabo demuestran que *FHG1* es el gen codificador de *FHG*s que muestra un mayor nivel de inducción en su expresión en respuesta a la exposición a NO exógeno. Por otra parte, los análisis de sensibilidad a condiciones de estrés nitrosativo indican que la enzima codificada por este gen es la que juega un papel más destacado en la resistencia a estrés nitrosativo del patógeno. Finalmente, es en los mutantes $\Delta FHG1$ en los que el efecto de inhibición de la germinación que observamos es más evidente. La enzima codificada por *FHG1* parece ser, por lo tanto, la enzima más importante desde el punto de vista funcional en la resistencia a estrés nitrosativo. Para confirmar que las alteraciones fenotípicas observadas son consecuencia, efectivamente, de la mutación $\Delta FHG1$, decidimos llevar a cabo un experimento de complementación de la mutación reintroduciendo la copia silvestre del gen *FHG1* en los mutantes SP1- $\Delta FHG1$ -131 y SP4- $\Delta FHG1$ -244.

Para ello diseñamos en primer lugar dos oligonucleótidos que permiten amplificar la copia genómica del gen *FHG1*. Las secuencias complementarias de estos oligonucleótidos se

encuentran en las regiones flanqueantes del gen *FHG1*, aproximadamente a 1 kb aguas arriba del codón de iniciación del gen el primero de ellos, y a 1 kb aguas abajo del codón de terminación del gen el segundo de ellos.

3.9.1 Construcción del vector de complementación

Los oligonucleótidos COMP-FOXG-17-F y COMP-FOXG-17-R (ver Tabla 6) poseen en su extremo 5' un sitio de restricción para las enzimas *PacI* el primero de ellos y *NT.Bbv.CI* el segundo. Con estos oligonucleótidos se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN genómico de FOP-SP1 de 3.6 kb que incluye la región estructural del gen *FHG1* y 1 kb de la región 5' flanqueante y 1 kb de la región flanqueante 3'. El fragmento fue purificado y clonado en el vector pGEM-T easy. Posteriormente, el inserto clonado fue liberado mediante digestión con las enzimas *PacI* y *NT.Bbv.CI*, recuperado de gel y ligado al vector pEA-FU (Figura 5) (previamente linearizado con las enzimas *PacI* y *NT.Bbv.CI*) utilizando el sistema User Friendly Cloning. Con el producto de la ligación se transformaron células competentes de *E. coli* cepa DH α 5. Entre los transformantes obtenidos se identificó un clon portador del plásmido buscado, que fue denominado vector de transformación pEA-FU-*FHG1*, con un tamaño de 5537 pares de bases (ver Figura 50A y Figura 50B).

3.9.2 Transformación de *A. tumefaciens*

El plásmido pEA-FU-*FHG1* (Figura 50A) fue introducido en *A. tumefaciens* cepa AGL1 mediante electroporación siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.9.5.2 de Materiales y Métodos. De entre las colonias transformantes obtenidas con este plásmido se seleccionó una que fue utilizada para llevar a cabo la transformación de los mutantes Δ *FHG1*-131 de FOP-SP1 y Δ *FHG1*-244 de FOP-SP4. La identidad del plásmido presente en la colonia seleccionada fue verificada mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos de las regiones flanqueantes y de la región codificante del gen *FHG1*.

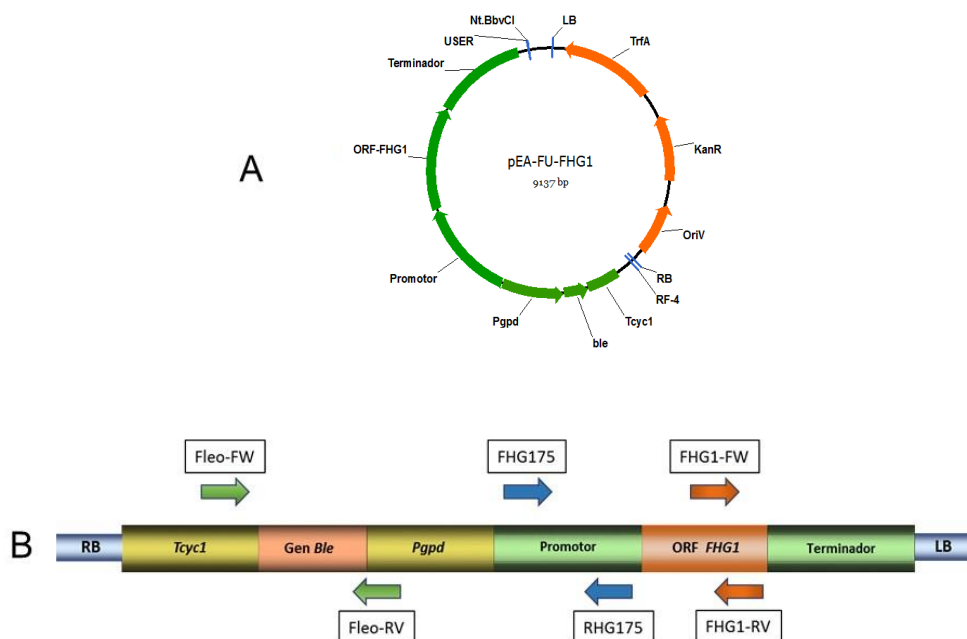


Figura 50. Panel A: Mapa de restricción del plásmido pEA-FU-*FHG1* utilizado para la complementación de la mutación $\Delta FHG1$. El fragmento de ADN que incluye la región codificante del gen *FHG1*, su región promotora y su región terminadora, fue amplificado con los cebadores COMP-FOXG-17-F y COMP-FOXG-17-R. El plásmido incluye el gen *ble* de resistencia a fleomicina para la selección de transformantes en *F. oxysporum*. Panel B: Representación detallada de la construcción generada para la complementación de la mutación $\Delta FHG1$ en la que se indica la ubicación de los oligonucleótidos utilizados para la discriminación de transformantes que han incorporado la construcción para la complementación de la mutación $\Delta FHG1$.

3.9.3 Transformación de mutantes $\Delta FHG1$ de FOP-SP1 y FOP-SP4

La transformación de *F. oxysporum* mediada por *A. tumefaciens* se realizó siguiendo la metodología mostrada en los apartados 2.9.5.3 y 2.9.5.4 de Materiales y Métodos. Se transformó el mutante $\Delta FHG1$ -131 de la estirpe FOP-SP1 y el mutante $\Delta FHG1$ -244 de la estirpe FOP-SP4. Los transformantes primarios que fueron apareciendo en las placas de medio selectivo en presencia de fleomicina fueron transferidos individualmente a placas de PDA con 400 a 600 $\mu\text{g/ml}$ de fleomicina e incubados durante 5 días a 25°C. De la estirpe $\Delta FHG1$ -131 se seleccionaron 10 transformantes resistentes a fleomicina y de la estirpe $\Delta FHG1$ -244 se seleccionaron 8 transformantes.

3.9.4 Identificación de transformantes que han incorporado la construcción de complementación

La discriminación de transformantes que habían incorporado la copia silvestre del gen *FHG1* se realizó mediante PCR con los cebadores FHG1-FW y FHG1-RV, que permiten

amplificar un fragmento de 481 pares de bases derivado de la región codificante del mismo. La Figura 51A, muestra los productos de amplificación obtenidos utilizando como ADN molde en las reacciones de PCR ADN genómico de dos transformantes obtenidos en la estirpe SP1- $\Delta FHG1$ -131, los identificados con los códigos SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 y SP1- $\Delta FHG1$ -131-C2. En las carreras correspondientes se visualiza el fragmento de ADN del tamaño esperado (481 nt), el del fragmento amplificado en la reacción preparada utilizando como ADN molde ADN genómico de la estirpe silvestre FOP-SP1 y ausente en la reacción de PCR preparada utilizando como ADN molde ADN genómico de la estirpe mutante SP1- $\Delta FHG1$ -131. En la Figura 51B se presenta el análisis correspondiente llevado a cabo sobre dos transformantes candidato obtenidos en la estirpe SP4- $\Delta FHG1$ -244, los identificados con los códigos SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1 y SP4- $\Delta FHG1$ -244-C2. La amplificación del fragmento esperado es indicativa de la reintroducción del alelo silvestre del gen *FHG1* en ambas estirpes mutantes.

Las cuatro cepas seleccionadas como candidatas fueron sometidas a un análisis tipo Southern. Éstas fueron cultivadas en medio de cultivo PDB y a partir del micelio recogido se extrajo ADN genómico que fue utilizado en el análisis de tipo Southern. Las muestras de ADN genómico fueron digeridas con la enzima *HindIII*, que no presenta sitios de restricción dentro de la construcción de transformación, y como sonda de hibridación se utilizó un fragmento de ADN derivado de la región 5' flanqueante del gen *FHG1*, amplificado y marcado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos FHG175 y RHG175, que permite detectar tanto el alelo silvestre del gen *FHG1* como el alelo mutante derivado del reemplazamiento del alelo silvestre del gen *FHG1*.

La Figura 51 muestra los patrones de hibridación obtenidos en el análisis de los transformantes candidatos obtenidos en la cepa SP1- $\Delta FHG1$ -131 (Panel B) y de los transformantes candidatos obtenidos en la cepa SP4- $\Delta FHG1$ -244 (Panel D). Se comprueba que en ambos casos, es decir, tanto en las cepas derivadas del mutante SP1- $\Delta FHG1$ -131 como en las cepas derivadas del mutante SP4- $\Delta FHG1$ -244, es posible detectar la banda de hibridación que representa el alelo mutante (consecuencia del reemplazamiento génico), la de mayor tamaño, y una segunda banda de menor tamaño que representa el alelo silvestre introducido mediante transformación clonado en el plásmido pEA-FU-*FHG1*, y que está ausente en las cepas mutantes SP1- $\Delta FHG1$ -131 y SP4- $\Delta FHG1$ -244. En la cepa SP1- $\Delta FHG1$ -131-C2 comprobamos que la banda correspondiente al alelo silvestre detectada en la cepa SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 no está presente, lo que supone que esta cepa constituye un falso positivo identificado en el

análisis mediante PCR, pero que no puede ser considerado como una cepa en la que se ha reintroducido el alelo silvestre *FHG1*.

Llevado a cabo este análisis fueron seleccionados para su análisis funcional posterior un representante de cada pareja de transformantes analizados, concretamente el transformante SP1- Δ *FHG1*-131-C1 de FOP-SP1 y el transformante SP4- Δ *FHG1*-244-C1 de FOP-SP4.

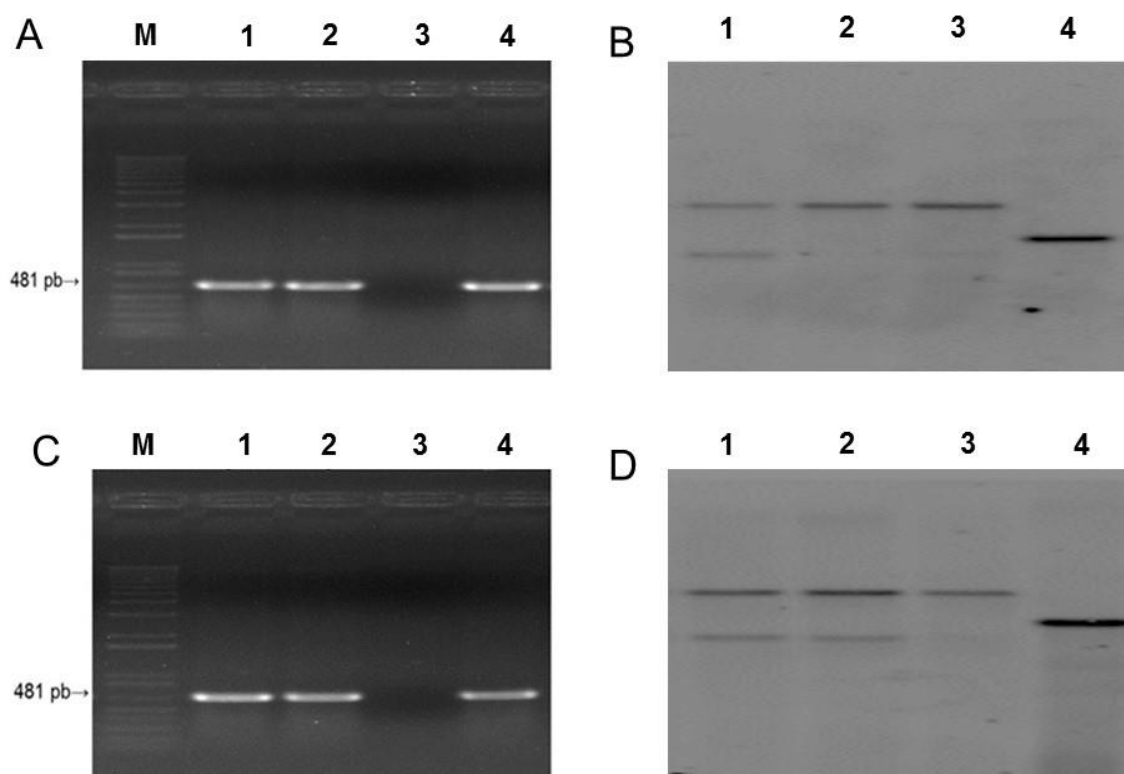


Figura 51. Identificación de los transformantes de las cepas SP1- Δ *FHG1*-131 y SP4- Δ *FHG1*-244 que han incorporado el gen *FHG1* mediante transformación con el plásmido pEA-FU-*FHG1*. Panel A: Productos de PCR amplificados con los cebadores FHG1-FW y FHG1-RV utilizando ADN genómico de los transformantes seleccionados, SP1- Δ *FHG1*-131-C1 y SP1- Δ *FHG1*-131-C2 (carriles 1 y 2), de la cepa mutante SP1- Δ *FHG1*-131 no transformada (carril 3) y de la estirpe silvestre FOP-SP1 (Carril 4). Carril M: marcador de peso molecular 1 kp plus DNA ladder (Invitrogen) Panel B: Análisis Southern de los transformantes seleccionados SP1- Δ *FHG1*-131-C1 y SP1- Δ *FHG1*-131-C2 (carriles 1 y 2), de la cepa mutante SP1- Δ *FHG1*-131 (carril 3) y cepa silvestre FOP-SP1 (carriles 4). Panel C: Productos de PCR amplificados con los cebadores FHG1-FW y FHG1-RV utilizando ADN genómico de transformantes seleccionados, SP4- Δ *FHG1*-244-C1 y SP4- Δ *FHG1*-244-C2 (carriles 1 y 2), de la cepa mutante SP4- Δ *FHG1*-244 no transformada (carril 3) y de la estirpe silvestre SP4 (Carril 4). Carril M: marcador de peso molecular 1 kp plus DNA ladder (Invitrogen). Panel D: Análisis Southern de los transformantes seleccionados, SP4- Δ *FHG1*-244-C1 y SP4- Δ *FHG1*-244-C2 (carriles 1 y 2), de la cepa mutante SP4- Δ *FHG1*-131 (carril 3) y de la cepa silvestre FOP-SP4 (carril 4). En las hibridaciones cuyos resultados se presentan en los paneles B y D, el ADN genómico fue digerido con la enzima *Hind*III y la sonda utilizada fue una sonda derivada del extremo 5' flanqueante del gen *FHG1*.

3.9.5 Análisis fenotípico de los mutantes portadores de la construcción de complementación de la mutación $\Delta FHG1$

El fenotipo de los transformantes seleccionados en los que se había reintroducido el alelo silvestre del gen *FHG1* fue comparado con el de las cepas silvestres correspondientes y con el de sus cepas mutantes $\Delta FHG1$, en relación con los dos aspectos fisiológicos considerados inicialmente, es decir, la sensibilidad a condiciones de estrés nitrosativo y la eficiencia de germinación. Este análisis se llevó a cabo en las mismas condiciones experimentales y aplicando los mismos procedimientos utilizados entonces. Así, para la evaluación de la sensibilidad a estrés nitrosativo las cepas analizadas fueron cultivadas en placas de Petri con medios MMG+A y MMG+N sólidos, en presencia y en ausencia del donador de NO (SNP 500 μ M). Para cada cepa y condición de cultivo se prepararon 3 placas y el crecimiento de cada colonia fue evaluado a los 4 y 5 días de cultivo. Para la evaluación de la eficiencia de germinación las suspensiones de microconidios de las cepas analizadas fueron cultivadas en medios MMG+A y MMG+N líquidos en presencia y en ausencia del donador de NO (250 μ M DETA) y los recuentos se efectuaron a las 10 horas de cultivo. El experimento fue repetido tres veces.

En la figura 52 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la sensibilidad a estrés nitrosativo de las cepas SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 (Panel A) y SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1 (Panel B) en comparación con sus respectivas cepas de referencia. Los datos de diámetro de la colonia fueron tomados a los 5 días de crecimiento saprofítico en las condiciones indicadas. En su análisis se comprueba que las dos cepas mutantes, SP1- $\Delta FHG1$ -131 y SP4- $\Delta FHG1$ -244, y en ambos medios de cultivo (en presencia de amonio y en presencia de nitrato como fuente de nitrógeno), manifiestan el fenotipo de hipersensibilidad a NO observado previamente, y que este fenotipo es revertido una vez reintroducido el alelo silvestre del gen *FHG1*, ya que el diámetro de colonia de las cepas SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 y SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1 es igual al de las colonias de las cepas FOP-SP1 (panel A) y FOP-SP4 (Panel B), respectivamente. Es decir, la reintroducción del alelo silvestre permite restaurar el fenotipo silvestre de resistencia a condiciones de estrés nitrosativo. Se puede deducir, por lo tanto, que la reducción del crecimiento en respuesta a NO exógeno mostrada por los mutantes SP1- $\Delta FHG1$ y SP4- $\Delta FHG1$ es consecuencia de la mutación inducida en el gen *FHG1*.

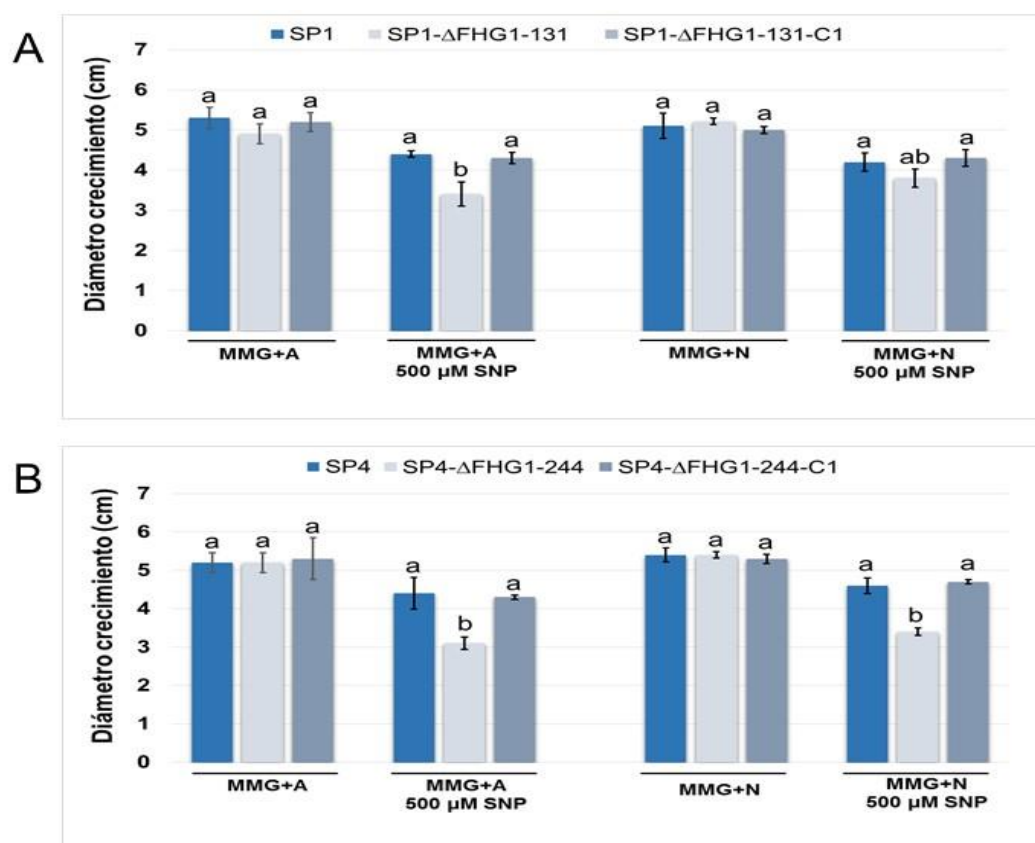


Figura 52. Evaluación de la sensibilidad a estrés nitrosativo de los mutantes complementados SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 y SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1 cultivados en MMG+A y MMG+N en ausencia y en presencia del donador de NO (500 μ M SNP). Panel A: Diámetro de la colonia de las cepas: FOP-SP1 (control), mutante nulo SP1- $\Delta FHG1$ -131 y cepa complementada SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1. Panel B: Diámetro de la colonia de las cepas FOP-SP4 (control), mutante nulo SP4- $\Delta FHG1$ -244 y cepa complementada SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1 en las condiciones indicadas. Los datos presentados corresponden a los valores medios de tres experimentos y sus correspondientes desviaciones estándar. Con los datos de las tres cepas analizadas en cada caso en cada medio y condición se llevó a cabo un análisis ANOVA. Medias con letra diferente en cada combinación son significativamente diferentes ($p < 0,05$) (test de Tukey).

En la figura 53 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de la germinación de microconidios de las cepas SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 (Panel A) y SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1 (Panel B) en comparación con sus respectivas cepas de referencia. Estos resultados confirman también las observaciones realizadas inicialmente, indicando que la exposición a NO determina una reducción de la germinación de los dos cepas silvestres utilizadas en nuestro trabajo, FOP-SP1 y FOP-SP4, tanto en presencia de amonio como en presencia de nitrato. La reducción es más evidente en el caso de los mutantes SP1- $\Delta FHG1$ -131 y SP4- $\Delta FHG1$ -244. Los transformantes en los que se ha reintroducido el alelo silvestre del gen *FHG1*, SP1- $\Delta FHG1$ -131-C1 y SP4- $\Delta FHG1$ -244-C1, recuperan los niveles de germinación característicos de la correspondiente cepa silvestre en cada medio de cultivo.

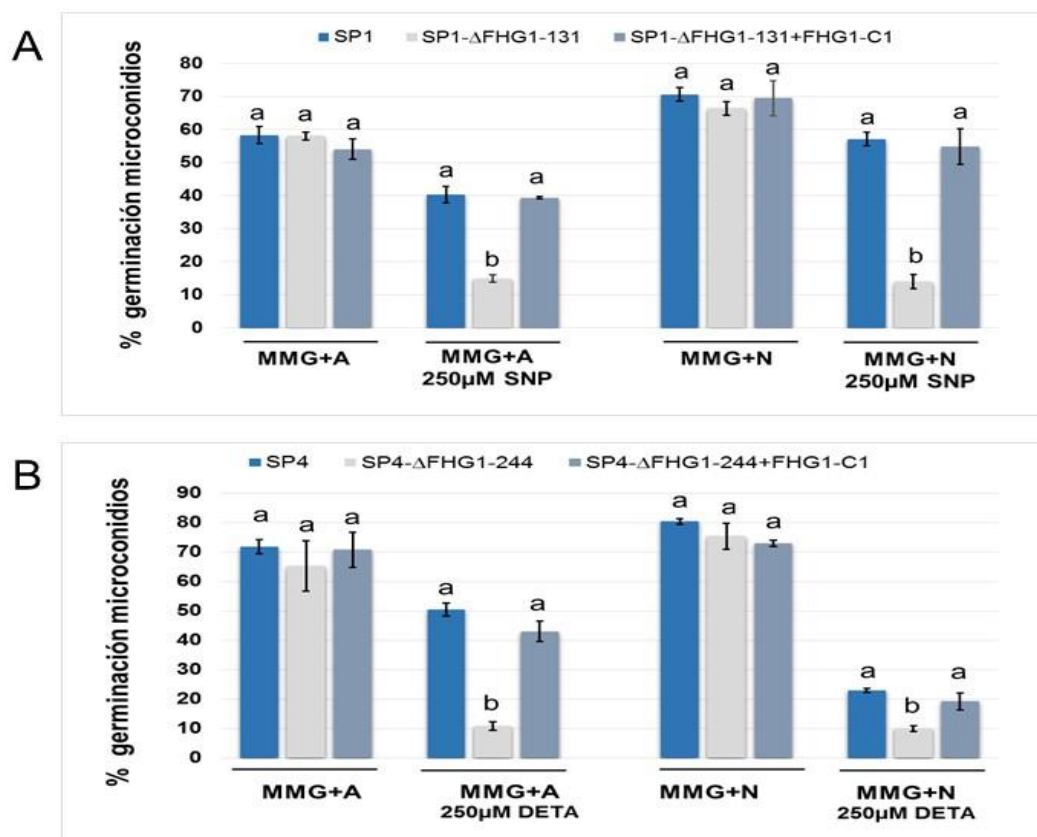


Figura 53. Evaluación de la eficiencia de germinación de microconidios de los mutantes complementados SP1-ΔFHG1-131-C1 y SP4-ΔFHG1-244-C1 cultivados en MMG+A y MMG+N en ausencia y en presencia del donador de NO (250 μM DETA) tomados a las 10 horas de cultivo. Panel A: Porcentaje de germinación de las cepas FOP-SP1 (control), del mutante nulo SP1-ΔFHG1-131 y de la cepa complementada SP1-ΔFHG1-131-C1 en las condiciones indicadas. Panel B: Porcentaje de germinación de las cepas FOP-SP4 (control), del mutante nulo SP4-ΔFHG1-244 y de la cepa complementada SP4-ΔFHG1-244-C1 en las condiciones indicadas. Los datos presentados corresponden a los valores medios de tres experimentos y sus correspondientes desviaciones estándar. Con los datos de las tres cepas analizadas en cada caso en cada medio y condición se llevó a cabo un análisis ANOVA. Las medias con letra diferente en cada condición son significativamente diferentes ($p < 0,05$) (test de Tukey).

Teniendo en cuenta la caracterización llevada a cabo en las cepas transformantes en las que se ha reintroducido el alelo silvestre del gen *FHG1* es posible concluir que el fenotipo de hipersensibilidad a NO que muestran las cepas mutantes en las que este gen ha sido eliminado, tanto en el fondo genético FOP-SP1 como en el fondo genético FOP-SP4, y como consecuencia del cual muestran una reducción de crecimiento en medio sólido y una reducción de la eficiencia de germinación en medio líquido en condiciones de estrés nitrosativo, es consecuencia exclusivamente de la mutación introducida.

3.10 Obtención y caracterización de dobles mutantes $\Delta FHG2$ - $FHG1$ RNAi.

El nivel de inducción de la expresión de *FHG1* en respuesta a NO exógeno durante la fase de germinación de las esporas, y el fenotipo de los mutantes $\Delta FHG1$ en las cepas FOP-SP1 y FOP-SP4, hipersensibles a condiciones de estrés nitrosativo, indican que este gen codifica la enzima flavohemoglobina que desempeña un papel más relevante en relación con la resistencia a condiciones de estrés nitrosativo de FOP. El gen *FHG2* también responde a nivel transcripcional a la exposición a NO exógeno, aunque de manera mucho más limitada. Además, los mutantes $\Delta FHG2$ muestran un cierto aumento en su sensibilidad a condiciones de estrés nitrosativo, si bien también en este caso de forma mucho más limitada que los mutantes $\Delta FHG1$. Estas observaciones nos llevaron a plantear la conveniencia de obtener mutantes dobles alterados simultáneamente en ambos genes, *FHG1* y *FHG2*, y analizar su fenotipo para determinar en qué medida ambas enzimas contribuyen a la resistencia a estrés nitrosativo. El patrón de expresión de *FHG2* indica que este gen responde a otros estímulos relacionados con la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y el desarrollo, además de la exposición a NO exógeno. Es posible asumir que la enzima flavohemoglobina codificada por *FHG2* pueda estar implicada en más de una función fisiológica.

La primera estrategia experimental consistió en generar, mediante reemplazamiento génico, mutantes alterados en *FHG2* en un fondo genético $\Delta FHG1$ (tanto en la cepa silvestre FOP-SP1 como en la cepa FOP-SP4). Después de varios intentos de transformación con resultados negativos (no se obtuvieron transformantes) decidimos aplicar una estrategia alternativa, basada en silenciamiento génico. En la misma se consideró inducir el silenciamiento del gen *FHG1* sobre el fondo genético de los mutantes $\Delta FHG2$ de FOP-SP1 y FOP-SP4. Para ello, se amplificó una secuencia de la región codificante del gen *FHG1* y se ligó a un vector de silenciamiento que posee dos promotores en direcciones opuestas cuya actividad genera un ARN bicatenario que es reconocido por el complejo de silenciamiento Dicer. La aplicación de esta estrategia supuso desarrollar las siguientes fases y procedimientos: (1) diseño de cebadores para la amplificación de un fragmento de ADN de la región codificante del gen *FHG1* para su clonación en un vector de silenciamiento; (2) construcción de un vector de silenciamiento en un plásmido portador de un marcador de resistencia a fleomicina, dado que los mutantes deficientes en el gen *FHG2* ya poseen un gen de resistencia a higromicina B; (3) transformación de *E. coli* y *A. tumefaciens* con los plásmidos generados; (4) transformación de mutantes deficientes en *FHG2* de FOP-SP1 y FOP-SP4 con el vector de silenciamiento; (5) identificación de

transformantes en los que se ha silenciado el gen *FHG1*; y (6) análisis fisiológico de mutantes silenciados de FOP-SP1 y FOP-SP4.

3.10.1 Construcción del vector de silenciamiento

Con los cebadores Sil-FHG1-FW Y Sil-FHG1-RV (Tabla 6) (diseñados con un sitio de restricción *NcoI* en el extremos 5' para facilitar su clonación) se amplificó un fragmento de 281 pares de nucleótidos de la región codificante del gen *FHG1* (ver Figura 54). Este fragmento fue purificado y clonado en el vector pGEM-T easy. Una vez liberado del plásmido derivado mediante la digestión con la enzima *NcoI* el inserto fue ligado al vector pVIR-RNAi (Figura 5) (previamente linealizado con la enzima *NcoI*). Con la mezcla de ligación se transformó *E. coli* cepa DH α 5. Entre los transformantes obtenidos se identificó una colonia portadora del plásmido deseado, que recibió el nombre de pVIR-RNAi-*FHG1*, cuyo tamaño es de 7535 pares de bases (ver Figura 55A).

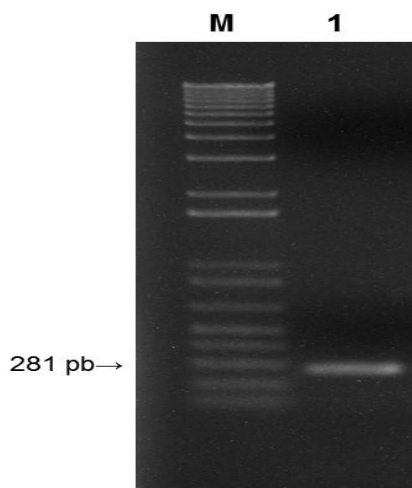


Figura 54. Producto de PCR amplificado a partir de ADN genómico de FOP-SP1 con los cebadores Sil-FHG1-FW y Sil-FHG1-RV visualizado en gel de agarosa 2 % (carril 1). Carril (M): Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

3.10.2 Transformación de *A. tumefaciens*

El plásmido pVIR-RNAi-*FHG1* (Figura 55A) fue introducido en *A. tumefaciens* cepa AGL1 mediante electroporación siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2.9.5.2 de Materiales y Métodos. De entre las colonias transformantes obtenidas se seleccionó una que fue utilizada para llevar a cabo la transformación de los mutantes SP1- Δ *FHG2*-51 de FOP-SP1 y SP4- Δ *FHG2*-314 de FOP-SP4. La identidad del plásmido presente en la colonia

seleccionada fue verificada mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos de los promotores del casete de silenciamiento y de la región codificante del gen de resistencia a fleomicina (Figura 55B).

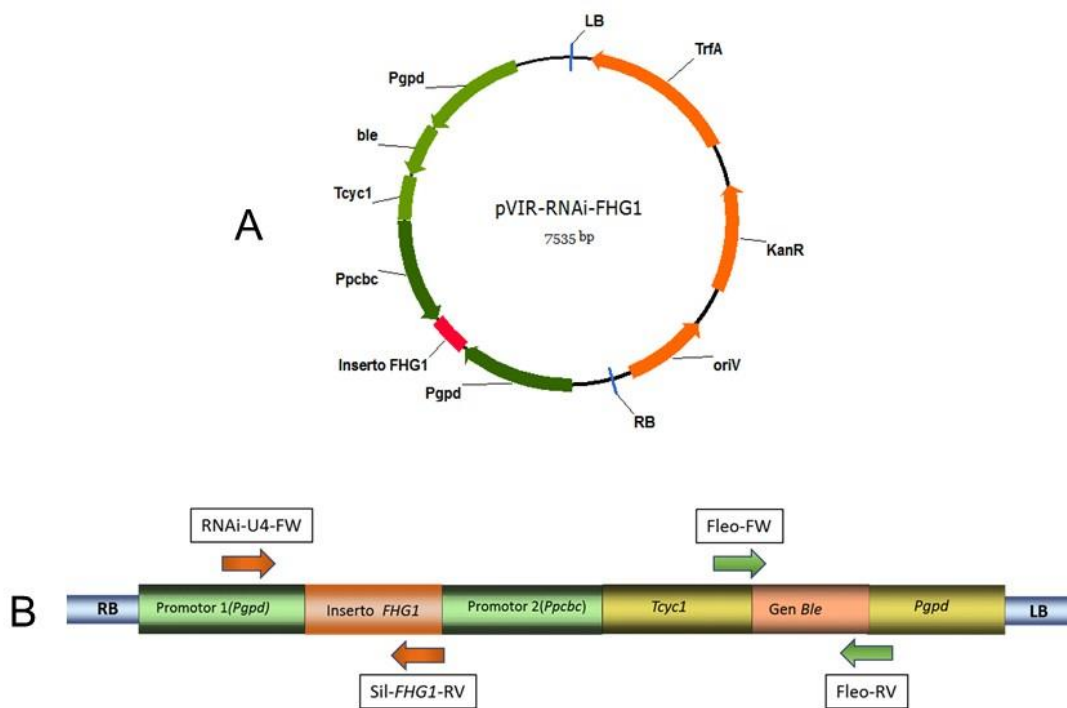


Figura 55. Panel A: Mapa de restricción del plásmido pVIR-RNAi-FHG1 utilizado para el silenciamiento del gen *FHG1*. Panel B: Representación detallada de la región clonada entre los extremos RB y LB del plásmido pVIR-RNAi-FHG1. Se indica la ubicación de los sitios de unión de los cebadores utilizados para la discriminación de transformantes que han incorporado el plásmido de la construcción de silenciamiento.

3.10.3 Transformación de mutantes $\Delta FHG2$ con el vector de silenciamiento pVIR-RNAi-FHG1

La transformación de *F. oxysporum* mediada por *A. tumefaciens* se realizó siguiendo la metodología mostrada en los apartados 2.9.5.3 y 2.9.5.4 de Materiales y Métodos. Se transformaron los mutantes deficientes del gen *FHG2*, tanto en la cepa FOP-SP1, identificado como mutante SP1- $\Delta FHG2$ -51, como en la cepa FOP-SP4, identificado como mutante SP4- $\Delta FHG2$ -314. Los transformantes primarios que fueron apareciendo en las placas de medio selectivo en presencia de fleomicina fueron transferidos individualmente a placas de PDA con 400 a 600 $\mu\text{g/ml}$ de fleomicina e incubados durante 5 días a 25°C. Se seleccionaron 10 transformantes para cada estirpe (SP1 y SP4).

3.10.3.1 Identificación y selección de transformantes $\Delta FHG2$ - $FHG1$ RNAi

Los transformantes seleccionados fueron cultivados en medio de cultivo PBD durante 3 días a 25°C y 120 rpm. El micelio producido fue recuperado por filtración y utilizado para la extracción de ARN total con el protocolo descrito en el apartado 2.6.4.2 de Materiales y Métodos. La cantidad y calidad del ARN fueron verificadas por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa 1 % en MOPS 1X.

La síntesis de cDNA a partir de ARN total y el procedimiento para la preparación de las muestras para las reacciones de RT-qPCR se describe en los apartados 2.12.2 y 2.12.3 de Materiales y Métodos. Los niveles de expresión del gen *FHG1* en las muestras preparadas fueron normalizados con los niveles de expresión constitutiva del gen codificador del factor de elongación 1 α (*EF1 α*) y referidos a los valores de expresión del gen *FHG1* de las cepas silvestres correspondientes (la cepa FOP-SP1 o la cepa FOP-SP4).

En la Figura 56 se presentan los resultados de los análisis de cuantificación de los niveles de expresión del gen *FHG1* en los transformantes seleccionados a partir de las cepas mutantes SP1- $\Delta FHG2$ -51 (Panel A) y SP4- $\Delta FHG2$ -314 (Panel B) transformadas con el vector de silenciamiento pVIR-RNAi-*FHG1*. En cada panel cada barra representa el nivel de expresión relativa del gen *FHG1* en la cepa indicada en relación con el nivel de expresión en la cepa silvestre. La expresión se cuantificó en esporas germinadas tras 9 h de incubación en medio MMG+A+SNP, condiciones en las cuales se había comprobado previamente que se produce el mayor incremento de expresión de *FHG1* (ver en la sección 3.5.2.1 Resultados). Se comprueba que los distintos transformantes silenciados muestran niveles de expresión variables del gen *FHG1*. Para los siguientes análisis se seleccionaron los transformantes que mostraron los niveles más bajos de expresión, esto es SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-1, SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-2, SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-3, SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-4 y SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-7. No se seleccionaron los transformantes identificados inicialmente con los números 27 y 30 ya que, a pesar de mostrar niveles de expresión menor a los demás transformantes seleccionados, mostraban también alteraciones en el crecimiento y morfología del micelio aéreo muy evidentes (quizás producto de la integración del plásmido transformante en una región sensible). En el caso de la cepa SP4- $\Delta FHG2$ -314, se seleccionaron los transformantes que muestran los niveles de expresión más bajos y que fueron denominados SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-

2, SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-3, SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-16, SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-17, SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-18 y SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-22.

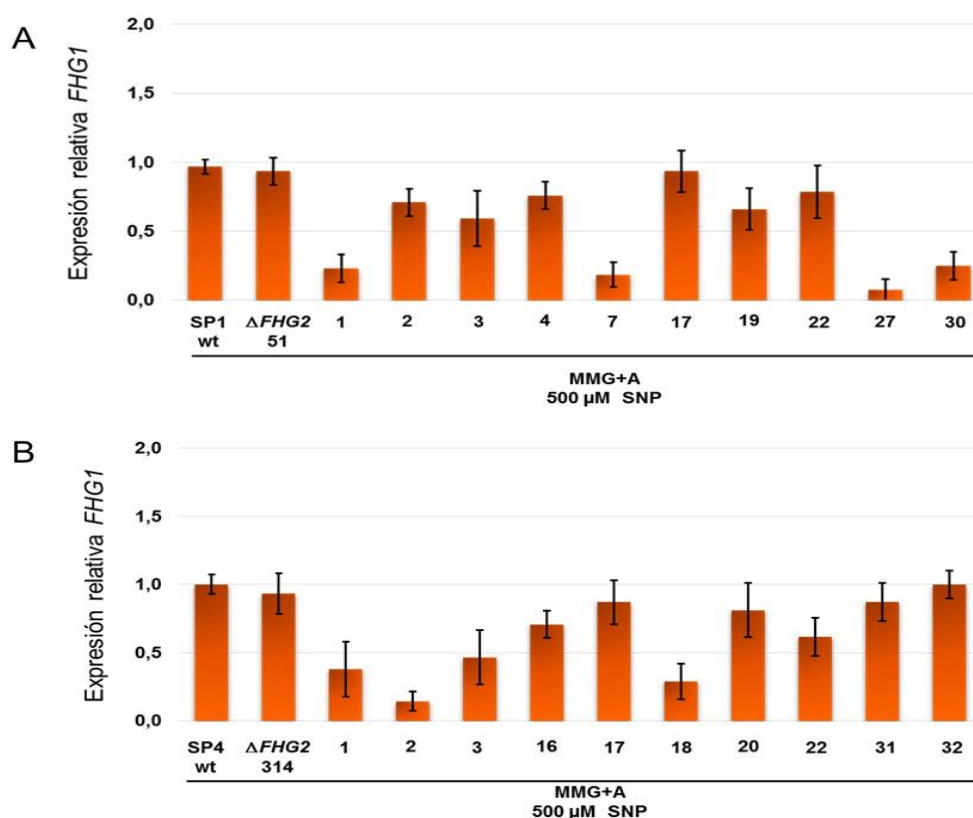


Figura 56. . Expresión relativa del gen *FHG1* en los transformantes seleccionados obtenidos con el plásmido pVIR-RNAi-*FHG1* sobre el fondo genético de los mutantes SP1- $\Delta FHG2$ -51 y SP4- $\Delta FHG2$ -314. Las muestras de RNA utilizadas en este análisis se obtuvieron de esporas cultivadas durante 9 h en medio mínimo con 1 % glucosa, suplementado con 10 mM de tartrato amónico (MMG+A), en presencia de 500 μ M de SNP. Panel A: Cepa silvestre FOP-SP1, cepa mutante SP1- $\Delta FHG2$ -51 y mutantes silenciados SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-1, 2, 3, 4, 7, 17, 19, 22, 27 y 30 (carreras 1 a 30). Panel B: Cepa silvestre FOP-SP4, cepa mutante SP4- $\Delta FHG2$ -314 y mutantes silenciados SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-1, 2, 3, 16, 17, 18, 20, 22, 31 y 32 (carreras 1 a 32). Los datos de expresión representan los niveles de expresión relativa del gen *FHG1* normalizados en relación con el nivel de expresión del gen *Efa1* y referidos en cada caso a los valores de expresión de las cepas silvestre

Para demostrar que en los transformantes en los que hemos detectado silenciamiento está presente, efectivamente, la construcción de silenciamiento decidimos llevar a cabo una caracterización de los mismos mediante PCR y mediante hibridación tipo Southern. Para ello en primer lugar se extrajo ADN genómico de las cepas mutantes silenciadas, de las cepas SP1- $\Delta FHG2$ -51 y SP4- $\Delta FHG2$ -314 y de las estirpes silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4. Para la caracterización mediante PCR las muestras de ADN genómico obtenidas fueron utilizadas directamente. Para el análisis mediante hibridación Southern el ADN en cada caso fue digerido con la enzima *HindIII* y separado por electroforesis en gel de agarosa 1

% y transferido a filtros de nylon. Los filtros resultantes fueron hibridados con una sonda derivada de la región de los promotores de silenciamiento incluidos en el plásmido de transformación amplificada por PCR con los cebadores RNAi-U4-FW y Sil-FHG1-RV (ver ubicación de los cebadores en la Figura 55B).

En la Figura 57 se presentan los resultados obtenidos en esta caracterización. En el Panel A se muestran los productos de PCR amplificados a partir del ADN genómico de la cepa mutante SP1- Δ FHG2-51 y de los transformantes SP1- Δ FHG2-51-FHG1RNAi-1, 2, 3, 4 y 7 en reacciones de PCR llevadas a cabo con los cebadores RNAi-U4-FW y Sil-FHG1-RV diseñados a partir de la secuencia del ADN del plásmido pVIR-RNAi-FHG1. El cebador Sil-FHG1-RV hibrida específicamente con un extremo del fragmento de ADN con la secuencia de silenciamiento y el cebador RNAi-U4-FW hibrida con la región correspondientes al promotor 1 del casete de silenciamiento (ver Figura 57B). Con el molde adecuado esta combinación de cebadores permite amplificar un fragmento de 768 pares de bases. Como se comprueba en el Panel A de la Figura 57, en todos los transformantes seleccionados se detecta la amplificación de un fragmento de ADN del tamaño esperado. En el Panel B de la Figura 57 se presenta el análisis Southern blot de estos mismos transformantes. En este análisis los filtros preparados fueron probados con una sonda marcada por PCR en una reacción llevada a cabo utilizando los cebadores RNAi-U4-FW y Sil-FHG1-RV (descritos anteriormente y utilizados en el análisis mediante PCR). Los resultados obtenidos muestran integración del casete de silenciamiento en diferentes posiciones en el genoma de la cepa receptora (sólo en el caso de los transformantes 3 y 4 el tamaño de la banda de hibridación detectada parece ser el mismo). En la Figura 57, Paneles C y D se presentan los resultados obtenidos aplicando las mismas aproximaciones experimentales (análisis mediante PCR en el caso del Panel C y análisis mediante hibridación Southern en el caso del Panel D) de los transformantes SP4- Δ FHG2-314-FHG1RNAi-2, 3, 16, 17, 18 y 22. En todos los transformantes analizados se detecta amplificación de un producto de PCR del tamaño esperado, confirmando la presencia del casete de silenciamiento, y las bandas de hibridación detectadas con la sonda utilizada muestran tamaños diferentes, indicativos de integraciones del casete de silenciamiento en posiciones diferentes del genoma de la cepa receptora.

Bansándonos en los resultados mostrados decidimos seleccionar dos transformantes silenciados en cada cepa mutante transformada para los posteriores análisis fisiológicos. Estos fueron los transformantes SP1- Δ FHG2-51-FHG1RNAi-1 y SP1- Δ FHG2-51-

*FHG1*RNAi-7 derivados de la cepa SP1- Δ *FHG2*-51 y los transformantes SP4- Δ *FHG2*-314-*FHG1*RNAi-2 y SP4- Δ *FHG2*-314-*FHG1*RNAi-18 derivados de la cepa SP4- Δ *FHG1*-314.

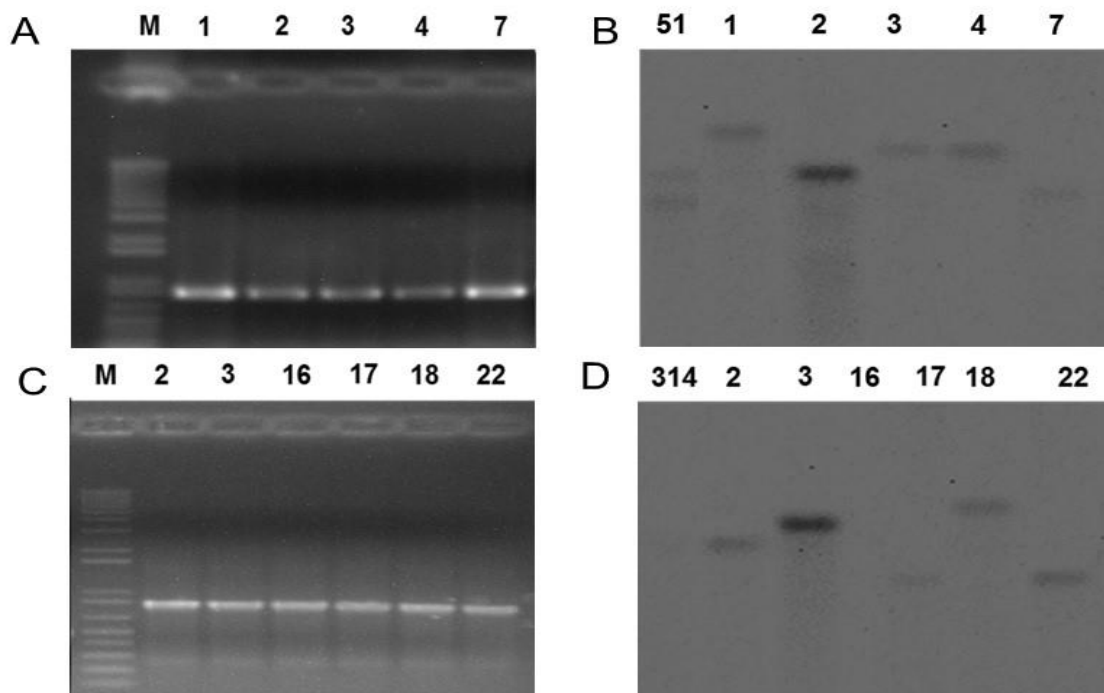


Figura 57. . Caracterización molecular de los transformantes SP1- Δ *FHG2*-51 y SP4- Δ *FHG2*-314 seleccionados en los experimentos de transformación llevados a cabo con el plásmido de silenciamiento pVIR-RNAi-*FHG1*. Panel A: Productos de PCR amplificados a partir de ADN genómico de transformantes silenciados de SP1- Δ *FHG2*-51 con los cebadores RNAi-U4-FW y Sil-FHG1-RV. Carril M: Marcador de peso molecular 1kp plus DNA ladder (invitrogen). Carriles (1, 2, 3, 4 y 7) producto de amplificación de ADN en los mutantes silenciados SP1- Δ *FHG2*-51-*FHG1*RNAi-1, 2, 3, 4 y 7. Panel B: Análisis mediante hibridación Southern de transformantes silenciados de SP1- Δ *FHG2*-51 hibridado con la sonda derivada del promotor e inserto del casete de silenciamiento. Carril 51: ADN de la cepa SP1- Δ *FHG2*-51. Carriles (1, 2, 3, 4 y 7) ADN de los mutantes silenciados SP1- Δ *FHG2*-51-*FHG1*RNAi-1, 2, 3, 4 y 7. Panel C: Producto de PCR amplificado a partir de ADN genómico de transformantes silenciados de SP4- Δ *FHG2*-314 con los cebadores RNAi-U4-FW y Sil-FHG1-RV. Carril M: Marcador de peso molecular 1kp plus DNA ladder (invitrogen). Carriles (2, 3, 16, 17, 18 22) producto de amplificación de ADN en los mutantes silenciados SP4- Δ *FHG2*-314-*FHG1*RNAi-2, 3, 16, 17, 18 22. Panel D: Análisis mediante hibridación Southern de transformantes silenciados de FOP-SP1 hibridado con la sonda derivada del promotor e inserto del casete de silenciamiento. Carril 314: ADN de la cepa SP4- Δ *FHG2*-314. Carriles (2, 3, 16, 17, 18y 22) ADN de los mutantes silenciados SP4- Δ *FHG2*-314-*FHG1*RNAi-2, 3, 16, 17, 18 22.

3.10.3.2 Análisis fenotípico de los dobles mutantes Δ *FHG2*-*FHG1*RNAi

Se evaluó la capacidad de crecimiento saprofítico y la sensibilidad a estrés nitrosativo de los transformantes silenciados seleccionados en comparación con los mutantes Δ *FHG2* de los que se derivan, SP1- Δ *FHG2*-51 y SP1- Δ *FHG2*-314, y sus correspondientes cepas tipo silvestre, FOP-SP1 y FOP-SP4, en ausencia y en presencia de un donador de NO. Para

ello todas las cepas objeto de estudio fueron cultivadas en placas Petri con medio mínimo con 1 % de glucosa suplementado con amonio o nitrato, en presencia y ausencia del donador de NO (500 μ M de SNP) en las mismas condiciones que las descritas en la sección 3.8.1 de Resultados.

En la Figura 58 se muestran los resultados del análisis de resistencia/sensibilidad a condiciones de estrés nitrosativo de las cepas mutantes SP1- Δ FHG2-51-FHG1RNAi-1 y SP1- Δ FHG2-51-FHG1RNAi-7 de FOP-SP1 y SP4- Δ FHG2-314-FHG1RNAi-2 y SP4- Δ FHG2-314-FHG1RNAi-18 de FOP-SP4 en comparación con las cepas mutantes deficientes en el gen FHG2 de las que derivan (SP1- Δ FHG2-51 y SP4- Δ FHG2-314) y de las propias cepas tipo silvestre FOP-SP1 y FOP-SP4. En el Panel A se presenta el análisis de las distintas cepas derivadas de FOP-SP1 en medios suplementados con amonio y nitrato como fuente de nitrógeno y en el Panel B el análisis correspondiente llevado a cabo con las cepas derivadas de FOP-SP4.

El análisis estadístico demuestra que los mutantes silenciados de FOP-SP1 en las dos fuentes de nitrógeno consideradas y en ausencia de NO exógeno no muestran diferencias significativas en el diámetro de la colonia en relación con la cepa tipo silvestre y con la cepa deficiente del gen Δ FHG2. La cepa silvestre FOP-SP1 y la cepa deficiente del gen FHG2, SP1- Δ FHG2-51, muestran sensibilidad a NO en ambos medios (con amonio y con nitrato), en unos niveles similares a los observados en los ensayos llevados a cabo anteriormente (sección 3.8.1.1 de Resultados). Efectivamente, FOP-SP1 muestra sensibilidad a NO y es más sensible aún la cepa mutante SP1- Δ FHG2-51. El análisis del comportamiento de los mutantes silenciados permite comprobar que la cepa SP1- Δ FHG2-51-FHG1RNAi-1 muestra un aumento adicional de su sensibilidad a NO, detectándose diferencias significativas en relación con la cepa mutante SP1- Δ FHG2-51 en el diámetro medio de la colonia en presencia de NO ($p < 0,05$), con una reducción del 20,5 % en medio con amonio y del 18,42 % en medio con nitrato en relación con aquél (ver Figura 58A). El segundo mutante silenciado seleccionado mostró un aumento de sensibilidad a NO mínimo en relación con la cepa mutante SP1- Δ FHG2-51, no detectándose diferencias significativas en el análisis estadístico.

El comportamiento de los mutantes silenciados de FOP-SP4 es similar al observado en los mutantes de FOP-SP1. La cepa de tipo silvestre y la cepa mutante en el gen FHG2, SP4- Δ FHG2-314, muestran niveles de sensibilidad a NO similares a los mostrados en ensayos anteriores (sección 3.8.1.2 de Resultados). En cuanto al comportamiento de los mutantes

silenciados en el gen *FHG1* analizados, se comprueba que en los dos medios considerados, tanto en presencia de amonio como de nitrato como fuente de nitrógeno, ambas cepas, SP4- Δ FHG2-314-*FHG1*RNAi-2 y SP4- Δ FHG2-314-*FHG1*RNAi-18, muestran un aumento adicional de sensibilidad a NO en comparación con la cepa SP4- Δ FHG2-314, y que ambas cepas tienen un comportamiento muy similar que reconoce el análisis estadístico. La reducción del diámetro de la colonia en relación con la cepa mutante SP4- Δ FHG2-314 es del 21,62 % y del 18,9 % para las cepas SP4- Δ FHG2-314-*FHG1*RNAi-2 y SP4- Δ FHG2-314-*FHG1*RNAi-18, respectivamente, en medio con amonio y del 15,79 % y 18,42 % en medio con nitrato (ver Figura 58B).

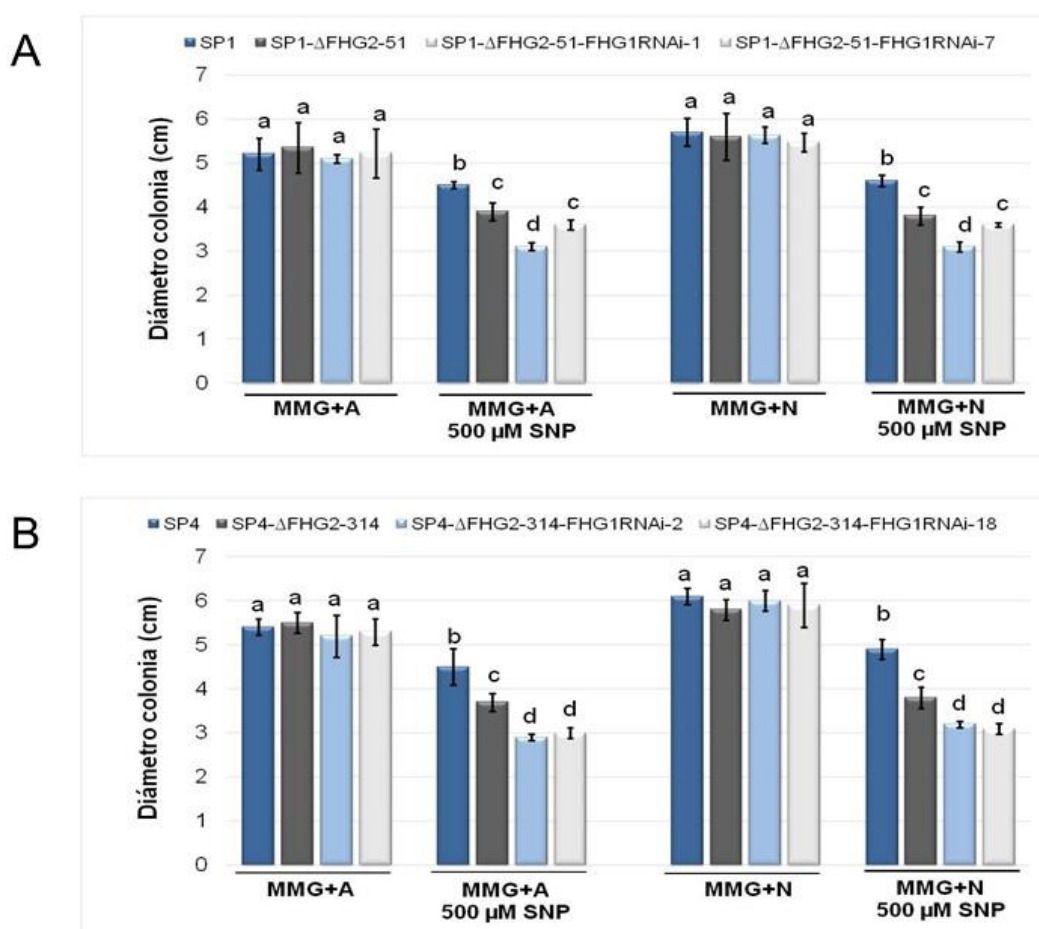


Figura 58. Evaluación del crecimiento saprofítico de mutantes Δ FHG2 en los que se ha silenciado el gen *FHG1*. Panel A: Cepa silvestre FOP-SP1, cepa mutante SP1- Δ FHG2-51 y mutantes silenciados SP1- Δ FHG2-51-*FHG1*RNAi-1 y SP1- Δ FHG2-51-*FHG1*RNAi-7. Panel B: Cepa silvestre SP4, cepa mutante SP4- Δ FHG2-314 y mutantes silenciados SP4- Δ FHG2-314-*FHG1*RNAi-2 y FOP-SP4- Δ FHG2-314-*FHG1*RNAi-18. Los cultivos se realizaron en medio mínimo con 1 % glucosa con amonio (MMG+A) y medio mínimo con 1 % glucosa con nitrato (MMG+N) en ausencia y presencia de 500 μ M de SNP. Los datos presentados corresponden a los valores medios de tres experimentos y sus correspondientes desviaciones estándar. Con los datos de las tres cepas analizadas en cada caso en cada medio y condición se llevó a cabo un análisis ANOVA. Las medias con letra diferente en cada condición de cultivo son significativamente diferentes ($p < 0,05$) (test de Tukey).

En resumen, en los mutantes silenciados de FOP-SP1, solamente la cepa silenciada SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-1 muestra una reducción adicional del diámetro de la colonia estadísticamente significativa en presencia de NO, tanto en medio suplementado con amonio como en medio suplementado con nitrato como fuente de nitrógeno, en relación con la cepa utilizada como referencia, el mutante SP1- $\Delta FHG2$ -51. En los mutantes silenciados de FOP-SP4, tanto la cepa SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-2 como la cepa SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-18 muestran sensibilidad adicional a NO (SNP) en ambos medios de cultivo en relación con la cepa de referencia, en este caso el mutante SP4- $\Delta FHG2$ -314.

Para evaluar la eficiencia de germinación de microconidios en los mutantes silenciados se utilizaron las mismas cepas utilizadas en los ensayos de evaluación de crecimiento saprofítico y de sensibilidad a estrés nitrosativo. Como fuente de NO se utilizó DETA 250 μ M. El propósito de estos ensayos fue evaluar los efectos fisiológicos que pudiera tener el NO exógeno sobre la germinación de microconidios en los mutantes silenciados en comparación con las cepas deficientes en el gen $\Delta FHG2$ en las cepas SP1 y SP4 (cepas SP1- $\Delta FHG2$ -51 y SP4- $\Delta FHG2$ -314) de las cuales se derivan cada uno de los mutantes silenciados y con sus respectivas cepas silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4, de las mismas que ya se conoce su comportamiento en ausencia y presencia de NO (DETA). Los medios de cultivo, el tiempo de evaluación y el análisis estadístico fueron los mismos utilizados en ensayos anteriores y descritos en la sección 3.8.2 de Resultados.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 59. Los mutantes silenciados de FOP-SP1 no muestran diferencias significativas en la eficiencia de germinación en ausencia de NO en relación con su cepa tipo silvestre FOP-SP1 y con la cepa deficiente del gen $\Delta FHG2$ correspondiente, SP1- $\Delta FHG2$ -51. Por otro lado, estas dos cepas muestran sensibilidad a NO en los dos medios considerados (con amonio y con nitrato) y unos niveles de reducción en la eficiencia de germinación en presencia de NO similares a los observados en ensayos anteriores (sección 3.8.2.1 de Resultados). En cuanto a los mutantes silenciados, SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-1 y SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-7, se comprueba que ambas cepas muestran una reducción adicional en la eficiencia de germinación en presencia de NO (DETA 250 μ M) al ser comparadas con la cepa mutante SP1- $\Delta FHG2$ -51 (y con la propia cepa de tipo silvestre FOP-SP1), reducción en el eficiencia de germinación de un 19,8 % y 17,1 %, respectivamente, en medio con amonio y del 24 % y 22 %, respectivamente, en medio con nitrato (ver Figura 59A).

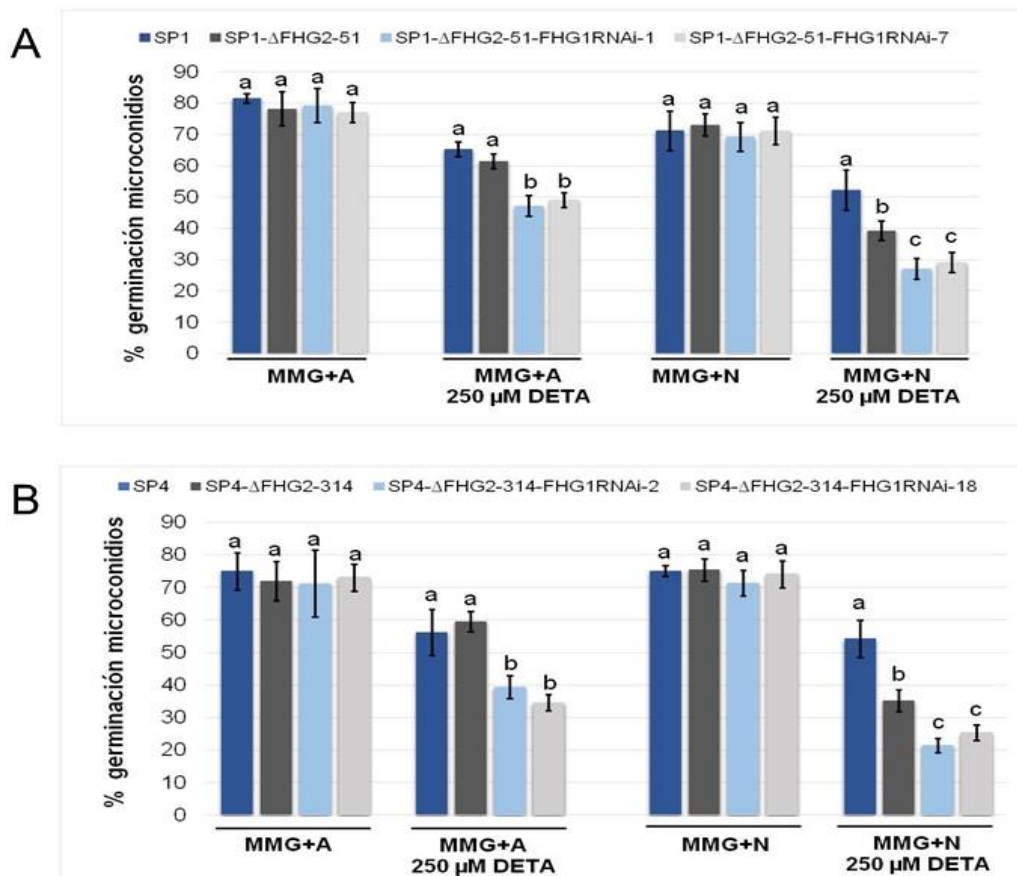


Figura 59. Cuantificación de la germinación de microconidios de mutantes $\Delta FHG2$ en los que se ha silenciado el gen *FHG1*. Panel A: Cepa silvestre FOP-SP1, cepa mutante SP1- $\Delta FHG2$ -51 y mutantes silenciados SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-1 y SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-7. Panel B: Cepa silvestre SP4, cepa mutante SP4- $\Delta FHG2$ -314 y mutantes silenciados SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-2 y SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-18. Los cultivos se realizaron en medio mínimo con 1 % glucosa con amonio (MMG+A) y medio mínimo con 1 % glucosa con nitrato (MMG+N) en ausencia y presencia de 250 μ M de DETA. Los datos presentados corresponden a los valores medios de tres experimentos y sus correspondientes desviaciones estándar. Con los datos de las tres cepas analizadas en cada caso en cada medio y condición se llevó a cabo un análisis ANOVA. Medias con letra diferente en cada condición de cultivo son significativamente diferentes ($p < 0,05$) (test de Tukey).

Los resultados obtenidos en el análisis de los mutantes silenciados derivados de FOP-SP4 son similares a los obtenidos con los mutantes derivados de FOP-SP1. La cepa tipo silvestre, FOP-SP4, y la cepa deficiente en el gen *FHG2*, SP4- $\Delta FHG2$ -314, muestran niveles de reducción en la eficiencia de germinación en presencia de NO similares a los observados en ensayos anteriores (sección 3.8.2.2 de Resultados). Por su parte, los dos mutantes silenciados, SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-2 y SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-18, muestran en presencia de NO una reducción adicional en la eficiencia de germinación en relación con la cepa mutante SP4- $\Delta FHG2$ -314 (y la cepa de tipo silvestre FOP-SP4), reducción que alcanza valores del 15,7 % y 20,1 %, respectivamente, en medio con amonio y del 22 % y 19,9 %, respectivamente, en medio con nitrato. Las diferencias con la cepa

SP4- $\Delta FHG2$ -314 son significativas y el análisis estadístico demuestra que ambas cepas mutantes muestran un comportamiento muy uniforme en los dos medios de cultivo (ver Figura 59B).

3.10.3.3 Ensayos de infección *in planta* con los dobles mutantes $\Delta FHG2$ - $FHG1$ RNAi

Finalmente se evaluó la agresividad sobre judía de los transformantes $\Delta FHG2$ silenciados en el gen *FHG1* de FOP-SP1 y FOP-SP4 seleccionados, en comparación con la agresividad de las cepas mutantes de $\Delta FHG2$ de las que derivan y de las propias cepas tipo silvestre. Los procedimientos de infección de plántulas de judía y la evaluación de la agresividad de los distintos aislados fueron los mismos utilizados previamente y descritos en secciones anteriores.

Los datos obtenidos en la evaluación de la agresividad durante cinco semanas se presentan en la Tabla 24. Estos datos se representan gráficamente en la Figura 60. Se comprueba que los dos transformantes SP1- $\Delta FHG2$ -51 seleccionados (SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-1 y SP1- $\Delta FHG2$ -51-*FHG1*RNAi-7) muestran la misma agresividad que la cepa SP1- $\Delta FHG2$ -51 de la que derivan y que la cepa tipo silvestre FOP-SP1. De la misma manera, los dos transformantes SP4- $\Delta FHG2$ -314 seleccionados (SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-2 y SP4- $\Delta FHG2$ -314-*FHG1*RNAi-18) muestran la misma agresividad que la cepa SP4- $\Delta FHG2$ -314 de la que derivan y que la cepa tipo silvestre FOP-SP4.

Tabla 24. Ensayos de infección en plantas de judía variedad “Blanca Riñón” con los mutantes silenciados (notación). En la primera columna se muestran las cepas tipo silvestre y los mutantes analizados. En las columnas 2 a 6 se representa el valor medio de la escala CIAT de todas las plantas para el aislado considerado en la semana indicada (\pm DE). Control: inoculaciones llevadas a cabo con agua.

SEMANAS					
Cepas	1	2	3	4	5
SP1	1 \pm 0.0	6.2 \pm 0.7	7.2 \pm 0.9	8.6 \pm 0.6	9 \pm 0.0
SP1- $\Delta FHG2$ -51- <i>FHG1</i> RNAi-1	1 \pm 0.0	5.5 \pm 0.6	7.3 \pm 0.7	8.1 \pm 0.7	8.9 \pm 1.0
SP1- $\Delta FHG2$ -51- <i>FHG1</i> RNAi-7	1 \pm 0.0	5.9 \pm 0.4	7.1 \pm 0.9	8.4 \pm 0.6	8.9 \pm 0.7
SP1- $\Delta FHG2$ -51	1 \pm 0.0	6 \pm 0.7	7.4 \pm 0.8	8.8 \pm 1.0	8.6 \pm 0.8
SP4	1 \pm 0.0	2.3 \pm 0.6	4 \pm 0.6	5.4 \pm 0.7	5.1 \pm 0.4
SP4- $\Delta FHG2$ -314- <i>FHG1</i> RNAi-2	1 \pm 0.0	3.3 \pm 1.0	3.8 \pm 0.5	5.1 \pm 0.6	5.5 \pm 0.5
SP4- $\Delta FHG2$ -314- <i>FHG1</i> RNAi-18	1 \pm 0.0	3.4 \pm 0.5	3.7 \pm 0.04	5.3 \pm 0.7	5.2 \pm 0.4
SP4- $\Delta FHG2$ -314	1 \pm 0.0	3 \pm 0.4	3.6 \pm 0.5	4.9 \pm 0.5	5 \pm 0.3
Control	1 \pm 0.0	1 \pm 0.0	1 \pm 0.0	1 \pm 0.0	1 \pm 0.0

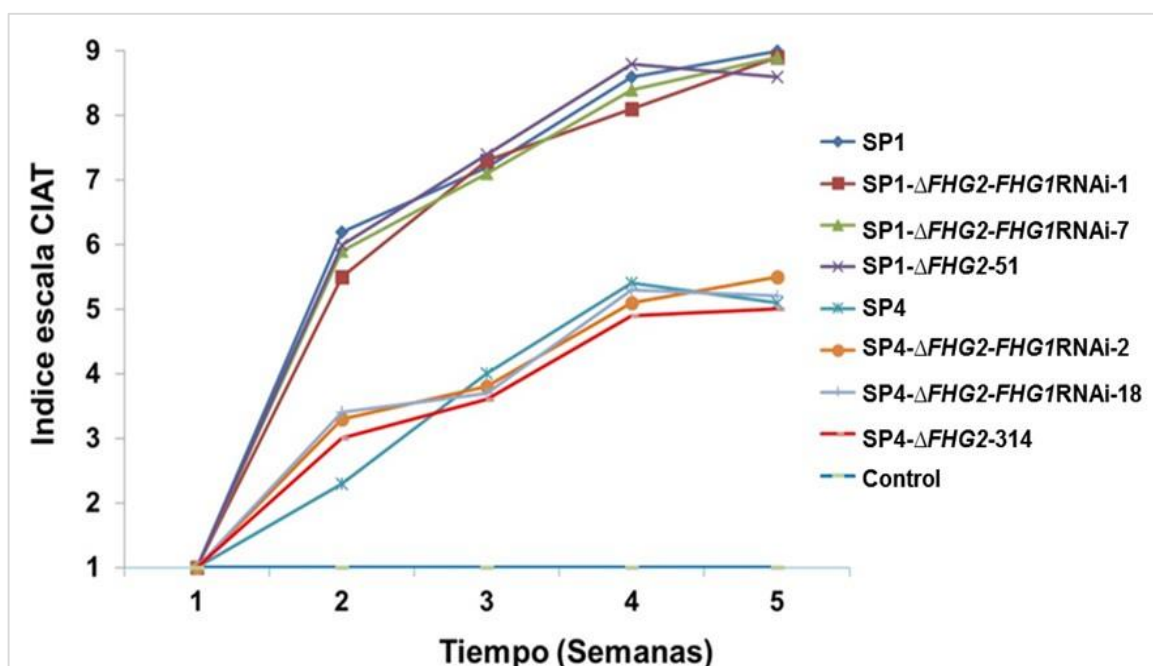


Figura 60. Evaluación de la agresividad de FOP-SP1 y FOP-SP4, de los mutantes SP1-ΔFHG2-51 y SP4-ΔFHG2-314 y de los transformantes silenciados seleccionados derivados de cada uno de ellos, SP1-ΔFHG2-51-FHG1RNAi-1 y SP1-ΔFHG2-51-FHG1RNAi-7, y SP4-ΔFHG2-314-FHG1RNAi-2 y SP4-ΔFHG2-314-FHG1RNAi-18, sobre la variedad de judía Blanca Riñón. Como control negativo se utilizaron plantas inoculadas con agua. Se utilizó la escala CIAT (1=planta sana a 9=planta totalmente afectada o muerta) para medir la progresión de la infección durante 5 semanas.

4 DISCUSIÓN

4.1 Relaciones filogenéticas de los genes *FHG* de FOP

Las proteínas de tipo flavohemoglobina derivan de globinas como consecuencia de procesos que tuvieron lugar antes de la emergencia de los archaea, los eucariotas y las bacterias (Vinogradov *et al.*, 2005). Los ancestros de las actuales flavohemoglobinas probablemente desaparecieron en los archaea, permaneciendo en bacterias y en eucariotas (Vinogradov *et al.*, 2005). Es interesante destacar el hecho de que en estos últimos las flavohemoglobinas sólo se encuentran en distintos grupos de microorganismos eucariotas, en particular de hongos.

La reconstrucción filogenética generada en este trabajo, teniendo en cuenta las secuencias de flavohemoglobinas representativas de distintos grupos taxonómicos, muestra en líneas generales las relaciones observadas previamente por otros autores que han trabajado en este grupo de proteínas en los organismos en los que estamos interesados (Turrión-Gómez *et al.*, 2010; te Biesebeke *et al.*, 2010). Durante los últimos años el número de secuencias relacionadas a disposición del investigador ha aumentado constantemente, permitiendo llevar a cabo análisis cada vez más precisos y robustos. En nuestro estudio identificamos en primer lugar un clado particular, el clado 4, en el que se agrupan la mayor parte de las flavohemoglobinas de origen bacteriano. Más próximas a éstas que a las flavohemoglobinas de otros hongos se encuentran las enzimas correspondientes descritas en distintas especies de levaduras. La mayor parte de las secuencias de flavohemoglobinas de hongos se integran en un agrupamiento específico de este grupo de organismos (que se conforma con un sólido soporte estadístico). En esta agrupación, que incluye los clados 1 y 2 mostrados en la Figura 18, se localizan las proteínas flavohemoglobinas FHG1, FHG2 y FHG3 de FOP. Es necesario llamar la atención sobre el hecho de que FHG4 no se incluye en esta agrupación. La proteína FHG4 se localiza en un clado diferente, el clado 3, ubicado entre la agrupación de los clados 1 y 2 y el clado 4, y de constitución muy particular, ya que incluye flavohemoglobinas presentes únicamente en algunas especies del género *Aspergillus* y que están relacionadas con flavohemoglobinas presentes en especies bacterianas muy concretas: *Chromobacterium*, *Bortedella*, *Burkholderia* y *Sinorhizobium*. Las tres primeras, FHG1, FHG2 y FHG3, por un lado, y esta

última, FHG4, por otro, representan probablemente tipos de flavohemoglobinas de características diferentes y presentan relaciones evolutivas particulares y diferenciales. El número de copias de los genes *FHG* en hongos varía de unas especies a otras. En ascomicetes, se ha descrito una copia en especies como *S. cerevisiae* (Zhu *et al.*, 1992) y *B. cinerea* (Turrión-Gómez *et al.*, 2010), dos en *P. anserina*, *N. crassa* y *F. graminearum*, tres en *C. albicans* (Ullman *et al.*, 2004) y en *F. verticilloides* y cuatro en *F. oxysporum* (este trabajo). Y observamos que entre los basidiomicetes la representación de genes *FHG* es más reducida: no han sido identificados en el genoma de especies representativas, como *Ustilago maydis* y *Coprinus cinereus* y *Laccaria bicolor*, y sólo se ha identificado una copia en el genoma de la especie *C. neoformans* (de Jesús-Berrios *et al.*, 2003). En aquellas especies en las que están presentes varias copias de los genes *FHG*, éstas no se agrupan en una misma rama del cladograma. En estos casos, además, una copia dada presenta generalmente más homología con copias de otras especies que con otras copias presentes en la misma especie. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el estudio de nuestro cladograma y de las relaciones filogenéticas que en él se presentan, en particular en relación con los clados 1 y 2, se pueden proponer varias hipótesis para explicar la evolución de los genes *FHG* en los fusaria: (1) Sucesivas duplicaciones y divergencia a partir de un gen ancestral, tal y como se ha propuesto para otros genes de *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016); (2) adquisición por transferencia horizontal, hipótesis que parece la más razonable para explicar la aparición de regiones específicas de *F. oxysporum* (Lineage Specific, LS), las cuales provendrían de otras especies del género *Fusarium*. Es muy posible que ambas explicaciones sean plausibles. Proponemos, que los genes *FHG* de *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. graminearum* que aparecen próximos en el clado 2, procederían de un ancestro común a las tres especies, si bien uno de los tres genes se habría perdido en *F. graminearum*. Por el contrario, el gen de *F. oxysporum* que aparece en el clado 3 (FHG4), próximo a genes de *FHG* de *Aspergillus* y Proteobacterias, podría haberse originado por transferencia horizontal (explicado en el siguiente párrafo).

El análisis de los genes de FHGs en especies del género *Aspergillus* ofrece resultados particulares y llamativos. En las distintas especies analizadas se han descrito dos copias de genes *FHG*. Aquellas de las especies *A. niger* y *A. clavatus*, junto con una copia de las especies *A. fumigatus*, *A. kawachii*, *A. oryzae* y *A. terreus*, se agrupan en el clado 1 junto con la única copia del gen *FHG* descrita en *B. cinerea* y en *S. sclerotiorum*, y no aparece ninguna copia en el clado 2. La segunda copia descrita en las especies *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* y *A. oryzae* aparece en el clado 3, que incluye como describíamos anteriormente, genes correspondientes a ciertos grupos bacterianos. Llama

poderosamente la atención la composición de este clado, que es el clado en el que se localiza la cuarta copia de un gen *FHG* de FOP. Resulta tentador, a la vista de la composición de este clado, proponer que hayan tenido lugar procesos de transferencia horizontal de genes entre especies de bacterias y alguna de estas especies de hongos, probablemente en tiempos muy tempranos, que permitan explicar la relación existente entre las secuencias correspondientes.

Como reflexionan diversos autores (Levasseur *et al.*, 2007; Te Bieseke *et al.*, 2010) y como recogen los libros de texto, los modelos de genética de poblaciones predicen que no es posible mantener copias completamente redundantes de genes dados en el genoma durante largos periodos de tiempo, ya que se irán acumulando mutaciones deletéreas y tenderán a ser eliminados. Y a la inversa, la divergencia funcional de copias duplicadas favorecerá el mantenimiento de las mismas. Acorde con este razonamiento, nuestra hipótesis de partida para el presente trabajo fue desentrañar la posible especialización funcional de los genes codificadores de proteínas FHG en *F. oxysporum*.

4.2 Análisis de expresión y funcional de los genes *FHG*

El hecho de encontrar varios genes codificadores de una determinada proteína en el genoma de una especie dada y de que éstos sean mantenidos en el proceso evolutivo permite considerar que las distintas copias sean funcionales. En el caso de FOP se han identificado cuatro copias de los genes *FHG*. El objetivo fundamental de nuestro trabajo ha sido determinar en qué procesos fisiológicos participan las enzimas codificadas por estos genes en las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4. Estas dos estirpes de *F. oxysporum* son patógenas de la judía común (por lo tanto forman parte de la forma especial *phaseoli*), y son representativas de estirpes muy virulentas y poco virulentas de esta forma especial (Alves-Santos *et al.*, 2002b; de Vega-Bartol, 2011). En el curso de este trabajo se han generado evidencias experimentales de tres tipos: las derivadas del análisis bioinformático de los genes y de las proteínas codificadas, las derivadas del análisis de expresión de los genes *FHG* en respuesta a distintos factores o estímulos, y las que se derivan de la caracterización fenotípica de los mutantes en los genes *FHG*.

Es necesario en este momento hacer una consideración particular. Para llevar a cabo el análisis de expresión y el análisis funcional descrito en primer lugar fue necesario establecer las condiciones óptimas de cultivo con el fin de conocer el comportamiento de las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4 en la germinación y desarrollo. Dado que inicialmente

era importante conocer el efecto sobre la sensibilidad a NO y sobre desarrollo, decidimos utilizar como medio de cultivo de referencia el medio en el que la germinación es más eficiente. Por esta razón se llevó a cabo el análisis de expresión en medios suplementados con amonio como fuente de nitrógeno. El amonio y/o la glutamina son las fuentes de nitrógeno preferidas por los hongos y en su presencia es reprimida la expresión de genes implicados en la asimilación del nitrato o nitrito (Marzluf, 1997; Berger *et al.*, 2008). Por lo tanto, nuestro análisis de expresión ha tenido en cuenta la condición de ausencia de fuente de nitrógeno y la condición de presencia de amonio, pero no ha valorado el efecto de la presencia de nitrato. Esta condición sí ha sido tomada en cuenta en el análisis fisiológico de los mutantes.

4.3 Los genes *FHG* de FOP muestran patrones de expresión diferenciales

La función principal de las proteínas de tipo FHG, ampliamente distribuidas en microorganismos procariotas y eucariotas, es la detoxificación de NO la cual llevan a cabo gracias a su actividad dioxigenasa dependiente de NADPH, FAD y O₂. Esta actividad dioxigenasa de la flavohemoglobina fue inicialmente descrita en la enzima hmp de *E. coli* (Gardner *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 1998) y posteriormente en las flavohemoglobinas de *Alcaligenes eutrophus* (Ermler *et al.*, 1995) y *S. cerevisiae* (Zhao *et al.*, 1996). La capacidad detoxificadora de la flavohemoglobina ha sido descrita desde entonces en numerosas especies de bacterias (Crawford and Golberg, 1998b; Cramm *et al.*, 1994; Favey *et al.*, 1995; LaCelle *et al.*, 1996) y de hongos (Hromatka *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2010; Turrión-Gómez *et al.* 2010; Lapp *et al.* 2014). En microorganismos la exposición a NO determina un aumento de la expresión del gen o de los genes codificadores de enzimas flavohemoglobinas, activando así un mecanismo inducible de resistencia frente a condiciones de estrés nitrosativo (Crawford and Goldberg, 1998a; Ullmann *et al.*, 2004; Poole *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2004; Sarver and DeRisi, 2005; Hromatka *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2010; Turrión-Gómez *et al.* 2010; Lapp *et al.*, 2014).

Los microorganismos eucariotas poseen frecuentemente varios genes codificadores de enzimas flavohemoglobina en sus genomas. Dentro del grupo de los hongos encontramos ejemplos de las distintas situaciones que cabe considerar. *B. cinerea* posee sólo uno, *Bcghg1* (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). Distintas especies del género *Aspergillus* poseen dos genes *FHG*. En el caso de *A. oryzae*, *Fhb1* codifica una flavohemoglobina de localización citoplasmática implicada en la detoxificación de NO en el citoplasma y *Fhb2* codifica una

flavohemoglobina de localización mitocondrial que participa en la detoxificación de NO en la mitocondria (Zhou *et al.*, 2010). *C. albicans* posee tres genes *FHG*, pero sólo uno está implicado en la detoxificación de NO (Ullmann *et al.*, 2004).

F. oxysporum posee cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina, conforme a los análisis efectuados con el ensamblaje de la estirpe 4287 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Este número de copias fue verificado posteriormente, en el curso de este trabajo, en otras formas especiales cuyos genomas han sido secuenciados (Broad Institute), y de forma experimental en las estirpes de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* constituye el sistema en el que más copias de genes *FHG* se han descrito hasta el momento. La conservación de la estructura general de la proteína y la presencia y organización de los tres dominios funcionales característicos de este tipo de enzimas en las proteínas de FOP sugieren que, efectivamente, las cuatro proteínas son flavohemoglobinas con actividad dioxigenasa. El análisis de localización subcelular establece una diferencia fundamental entre ellas, ya que FHG1, FHG2 y FHG3 tienen localización citoplasmática mientras que FHG4 tiene localización mitocondrial. La presencia de una pre-secuencia de localización mitocondrial no es la única característica que separa a FHG4 de las demás proteínas FHG de FOP: las relaciones de similitud en la secuencia de aminoácidos en conjunto también dan soporte a esta diferenciación. FHG4 está relacionada de forma más próxima con la flavohemoglobina de localización mitocondrial de *A. fumigatus* (Lapp *et al.*, 2014), *A. oryzae* (Zhou *et al.*, 2010) y *A. niger* (Te Bieseke *et al.*, 2010), proteínas que, a su vez, están más relacionadas con las flavohemoglobinas de bacterias. Nuestro análisis de expresión demuestra que FHG4 no se expresa a niveles detectables mediante análisis Northern en ninguna de las condiciones evaluadas y los valores de acumulación de transcrito detectados mediante qPCR no permiten llevar a cabo una cuantificación fiable. Si FHG4 se expresa en alguna de las condiciones analizadas, ciertamente es a niveles muy bajos. Si no responde a NO exógeno, es posible proponer que FHG4 no forma parte en FOP de un posible sistema inducible de respuesta a las condiciones de estrés nitrosativo que se imponen mediante la adición de un donador de NO, pero con la información acumulada hasta el momento no podemos elaborar una propuesta sobre los procesos fisiológicos en los que FHG4 pudiera participar. Quizás FHG4 constituya una copia no funcional de la familia FHG en FOP. No obstante, el hecho de que la proteína codificada sea una proteína de localización mitocondrial permite considerar que FHG4 pudiera estar relacionada con procesos del metabolismo del NO (incluida la defensa frente a condiciones de estrés nitrosativo localizado) que tienen lugar específicamente en la mitocondria. Este es el papel descrito para las proteínas Fhb2 y fhbB

en *A. oryzae* y *A. fumigatus*, respectivamente, en las cuales se ha identificado una secuencia señal mitocondrial y que son las proteínas responsables de la detoxificación del NO a nivel mitocondrial (Zhou *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010).

A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, la revisión de la literatura sobre flavohemoglobinas en *F. oxysporum* nos coloca frente a una información que plantea ciertas contradicciones. *F. oxysporum* ha sido descrito desde hace tiempo como un hongo denitrificador (Shoun *et al.*, 1992). La denitrificación en hongos constituye una forma de respiración anaerobia que utiliza el nitrato como aceptor de electrones, y sus componentes están localizados en la mitocondria (Kobayashi *et al.*, 1995). Takaya y colaboradores, en el curso de la caracterización de este sistema en *F. oxysporum*, describieron el aislamiento y purificación de una proteína de tipo flavohemoglobina a partir de cultivos del hongo crecido en condiciones de anaerobiosis (Takaya *et al.*, 1997). En este trabajo los autores llegan a purificar una flavohemoglobina, efectivamente, y determinan la secuencia de su extremo amino terminal. Y proponen que esta flavohemoglobina es la enzima implicada en denitrificación en *F. oxysporum*. Pero comprobamos que la secuencia descrita entonces coincide exactamente con la secuencia de la proteína *FHG2* que describimos en nuestro trabajo. *FHG2* carece de señal de localización mitocondrial (*FHG4* es la única de las cuatro flavohemoglobinas aquí descritas que presenta tal señal de localización mitocondrial) lo cual suscita dudas sobre su localización en la mitocondria. Y por otra parte, el gen *FHG2* se expresa en condiciones de aerobiosis y responde a NO exógeno, mientras que Takara y colaboradores utilizan unas condiciones de cultivo descritas como aquellas que permiten “la mejor actividad denitrificante”, esto es, condiciones de anaerobiosis. Teniendo en cuenta estas observaciones resultan evidentes ciertas contradicciones entre la situación descrita por estos autores y la derivada de la consideración de las cuatro copias de los genes *FHG* presentes en el genoma de *F. oxysporum*. Es posible proponer que la flavohemoglobina de localización mitocondrial que participa en denitrificación en condiciones de anaerobiosis sea *FHG4*, pero que Takara y colaboradores en su momento purificaran otra de las proteínas *FHG* de *F. oxysporum*, quizás incluso más abundante, que responde a las características generales de las flavohemoglobinas, y que también se expresa en las condiciones de cultivo que estos autores utilizaron. En cualquier caso, el gen *FHG4* muestra características peculiares que lo separan de los otros tres genes *FHG* descritos en *F. oxysporum*.

Los genes *FHG1*, *FHG2* y *FHG3* están, efectivamente, más relacionados filogenéticamente entre sí y responden transcripcionalmente a los estímulos considerados. Aunque de distinta

manera y con magnitudes diferentes, los tres genes responden a la exposición a NO exógeno (*FHG3*, en particular, lo hace de forma muy limitada). Esta inducción de la transcripción por exposición a un donador de NO es una respuesta esperada para un gen que codifica un componente esencial de un mecanismo de detoxificación de NO. Cuantitativamente la respuesta de *FHG1* a NO es la más fuerte y sólo se produce en la fase de germinación de las esporas. Esta inducción no es bloqueada por la presencia de amonio en el medio de cultivo. El gen *FHG2* también responde a NO, pero sólo lo hace de forma clara durante la fase de germinación. En esta fase la presencia de amonio tampoco bloquea (o inhibe) la inducción de la expresión en respuesta a NO. Es decir, durante la germinación *FHG1* y *FHG2* tienen una respuesta similar a la exposición a NO y a la presencia de amonio en el medio de cultivo. Cabe pensar que ambos genes están implicados, en este estadio de desarrollo, en un mecanismo de defensa inducible en respuesta a NO, el cual es independiente de la presencia de amonio, y que las enzimas codificadas participan en la detoxificación del NO al que las esporas del hongo son expuestas. Debemos recordar en este momento que en el sistema modelo de *A. nidulans* el cultivo del hongo en presencia de nitrato induce la expresión de genes de asimilación de nitrato y que el gen *FhbA*, codificador de la enzima flavohemoglobina inducible de este organismo, está co-regulado con estos genes de asimilación de nitrato. En *A. nidulans* se ha comprobado, además, que la adición de amonio reprime la expresión de genes de metabolismo de nitrógeno relacionados con la asimilación de nitrato como parte de un mecanismo de represión metabólica por amonio. Es interesante destacar que los trabajos llevados a cabo por Schinko *et al.* (2010) demuestran que la expresión de *FhbA* escapa a esta represión metabólica por amonio y que su expresión se induce por exposición a NO incluso en presencia de amonio. Los autores consideran que estas observaciones probablemente reflejan la importancia que tiene la detoxificación de NO en este organismo, haciendo que se induzca la expresión del gen *FhbA* por exposición a NO independientemente del estado celular en relación con el metabolismo del nitrógeno. La expresión de *FHG1* y *FHG2* observada en *F. oxysporum* durante la germinación de conidios es muy similar a la descrita en *A. nidulans*, y sugiere la participación de las proteínas codificadas por ambos genes en un mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés nitrosativo que debe ser independiente de una regulación por metabolismo de nitrógeno. En nuestro trabajo no hemos evaluado la expresión de los genes de asimilación de nitrato en presencia de amonio en *F. oxysporum*. No obstante, dado que se trata de un mecanismo generalizado en hongos (Marzluf 1997; Berger *et al.*, 2008), proponemos que el mecanismo de regulación negativa de los genes de asimilación de nitrato por amonio debe operar también en *F. oxysporum*. Es interesante destacar que en *F. oxysporum* hay

un mecanismo de activación de funciones de virulencia reprimido por amonio y que depende de la expresión de las proteínas TOR y MeaB (López-Bergés *et al.*, 2010). Sin embargo, esta regulación dependiente de fuente de nitrógeno es independiente de AreA, el activador general de genes codificadores de enzimas implicadas en la utilización de fuentes de nitrógeno distintas a las favoritas, amonio y glutamina.

FHG2 muestra un patrón de expresión muy diferente en la otra fase de desarrollo considerada, la fase de crecimiento del micelio, en la cual la expresión es máxima en medio mínimo con glucosa en ausencia de fuente de nitrógeno. En esta fase la expresión de *FHG2* es reprimida en presencia de amonio, una respuesta que encaja en la represión metabólica por amonio descrita en hongos (Marzluf, 1997) y, sorprendentemente, la represión se mantiene aún en presencia de NO. Es decir, en la fase de micelio, en la que no hemos podido detectar (y cuantificar) expresión de *FHG1*, *FHG2* muestra respuestas transcripcionales que sugieren que participa en procesos específicos de esta etapa de desarrollo probablemente más relacionadas con el metabolismo del nitrógeno en general que con una respuesta específica de defensa frente a NO.

Por su parte, *FHG3* muestra un patrón de expresión similar en esporas y en micelio (no hay regulación por desarrollo) y con una respuesta a la exposición a NO, como indicábamos anteriormente, muy limitada. Sí muestra una respuesta a amonio, cuya presencia estimula su expresión durante la germinación de las esporas, estimulación que no se observa en los genes *FHG1* y *FHG2*. Por lo tanto, *FHG3* también muestra respuestas que sugieren una posible participación en metabolismo del nitrógeno en general, no específicamente en detoxificación de NO. Sin embargo, la respuesta observada no deriva de una posible represión metabólica por presencia de amonio sino, más bien al contrario, de estimulación de la expresión en presencia de esta fuente de nitrógeno. Estas variadas respuestas transcripcionales sugieren que la disponibilidad de tres genes *FHG* (1, 2 y 3) puede proporcionar a *F. oxysporum* una notable versatilidad metabólica frente a fuente de nitrógeno, la cual puede resultar útil en determinadas condiciones ambientales.

Tomadas en conjunto, estas observaciones permiten considerar que en *F. oxysporum* los genes *FHG1*, *FHG2*, y *FHG3* son funcionales y han adquirido funciones específicas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno en general, y del NO en particular, y la fase de desarrollo. En concreto, *FHG1* y *FHG2* participan específicamente en la respuesta a estrés nitrosativo durante la germinación de esporas.

4.4 Los genes *FHG1* y *FHG2* confieren resistencia a estrés nitrosativo

La caracterización funcional de los mutantes deficientes en los genes *FHG* proporciona información adicional sobre la posible función de cada uno de ellos. En este trabajo hemos caracterizado dos mutantes independientes en cada gen *FHG* en las dos cepas de interés, FOP-SP1 y FOP-SP4. Los resultados obtenidos en ambas cepas para cada gen analizado son muy similares.

Los trabajos realizados en este estudio demuestran que las cepas de tipo silvestre FOP-SP1 y FOP-SP4 son sensibles al estrés nitrosativo producido por el NO, sensibilidad que manifiestan independientemente de la fuente de nitrógeno en la que son cultivadas. Se ha comprobado que los mutantes alterados bien en el gen *FHG1*, bien en el gen *FHG2*, pero no los mutantes alterados en *FHG3* o en *FHG4*, son hipersensibles a NO exógeno. Estos resultados sugieren que *FHG1* y *FHG2* son las flavohemoglobinas que juegan un papel más importante en la detoxificación de NO exógeno en FOP y responsables de mantener la concentración de NO en el interior de la célula dentro de unos niveles compatibles con el normal funcionamiento del metabolismo celular.

Esta función protectora frente a condiciones de estrés nitrosativo, inferida a partir del análisis de sensibilidad a NO llevado a cabo sobre las cepas mutantes, es la función descrita en distintos microorganismos en los que también se han utilizado los mutantes correspondientes para determinar la función de la proteína. Es el caso de *E. coli*, sistema en el que los mutantes en el gen *hmp* son más sensibles a la inhibición del desarrollo por exposición a NO (Gardner *et al.*, 1998) y cuya caracterización ha permitido, además, comprobar que la proteína HMP participa en la reparación de los daños causados por estrés oxidativo en los lípidos de membrana. De igual manera se ha comprobado que en *Salmonella typhimurium* la flavohemoglobina codificada por *hmp* protege a la bacteria del estrés nitrosativo, metabolizando NO en crecimiento aerobio y anaerobio (Crawford and Goldberg, 1998). En la bacteria *E. chrysanthemi* se ha demostrado que los mutantes deficientes en el gen *HmpX* muestran sensibilidad a NO, demostrando que la proteína flavohemoglobina HmpX es la responsable de proteger a la bacteria del estrés nitrosativo (Boccarda *et al.*, 2005). En hongos también se han obtenido evidencias funcionales basadas en la caracterización de mutantes, permitiendo describir en estos sistemas situaciones distintas. Por ejemplo, en *B. cinerea* los mutantes deficientes en el único gen codificador de enzimas flavohemoglobina, *Bcfhg1*, son hipersensibles a NO (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). En *C. albicans* existen 3 genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina

pero sólo los mutantes en uno de ellos, el gen *CaYHB1*, son hipersensibles a NO e incapaces de detoxificar NO (Ullmann *et al.*, 2004). En distintas especies del género *Aspergillus* existen dos genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina. En *A. oryzae* la eliminación de *Fhb1* determina hipersensibilidad a NO, pero no la eliminación de *Fhb2* (Zhou *et al.*, 2010). Una situación similar ha sido descrita en *A. fumigatus*, sistema en el que la eliminación de *FhpA* determina aumento de sensibilidad a NO, pero no la eliminación de *FhpB* (Lapp *et al.*, 2014). En estas especies el segundo gen, *Fhb2* y *FhpB*, respectivamente, codifica una proteína flavohemoglobina de localización mitocondrial, probablemente equivalente a la codificada por *FHG4* que probablemente no tiene que ver con detoxificación de NO exógeno (Lapp *et al.*, 2014; Marcos *et al.*, 2016).

Nuestro trabajo demuestra que en *F. oxysporum* existen dos flavohemoglobinas que desempeñan un papel importante en la detoxificación de NO, ya que los mutantes $\Delta FHG1$ y los mutantes $\Delta FHG2$ son hipersensibles a NO, mostrando los mutantes $\Delta FHG1$ una mayor reducción de crecimiento en presencia de NO que los mutantes $\Delta FHG2$. Esto supone que la flavohemoglobina FHG1 tiene una contribución más relevante en la detoxificación de NO exógeno que la proteína FHG2. El análisis fenotípico de los mutantes $\Delta FHG1$ en los que ha reintroducido el alelo silvestre del gen *FHG1* demuestra que, tanto en la cepa FOP-SP1 como en la cepa FOP-SP4, la reintroducción del alelo silvestre restaura completamente la función de *FHG1*, demostrando que la hipersensibilidad a NO observada en los mutantes es consecuencia exclusivamente de la eliminación del gen *FHG1*.

Nuestro trabajo demuestra, además, que en *F. oxysporum* los genes *FHG3* y *FHG4* no tienen una participan relevante en la detoxificación de NO, ya que los mutantes $\Delta FHG3$ y $\Delta FHG4$ no manifiestan hipersensibilidad a NO exógeno. *FHG3* sí responde transcripcionalmente a la exposición a NO, pero dado el fenotipo de los mutantes $\Delta FHG3$, o la contribución de la enzima codificada a la capacidad de detoxificar NO es muy pequeña o su carencia puede ser compensada por alguna, o por varias, de las otras tres enzimas FHG de *F. oxysporum*.

Asimismo, se puede descartar que la presencia de varios genes codificadores de FHG en *F. oxysporum* suponga una redundancia funcional en la actuación de las correspondientes enzimas. Los mutantes $\Delta FHG1$ y $\Delta FHG2$ presentan un claro fenotipo de hipersensibilidad a NO, a pesar de que los análisis genéticos demuestran que sólo un alelo *FHG* ha sido alterado en cada uno de ellos. Los resultados obtenidos indican que ambas enzimas son

necesarias para proporcionar una defensa total frente a condiciones de estrés nitrosativo, si bien ambas enzimas parece que contribuyen en distinta medida. Para determinar experimentalmente la contribución conjunta de las proteínas codificadas por *FHG1* y *FHG2* a la detoxificación de NO decidimos anular la función de ambos genes. En principio, la eliminación simultánea de ambas actividades enzimáticas debería determinar una sensibilidad a NO aún mayor en las cepas en las que ambos genes son eliminados. La situación ideal para este tipo de estudio hubiera sido aquella en la que se hubieran caracterizado mutantes nulos por delección de ambos genes. No obstante, en el curso de este trabajo no ha sido posible obtener dichos mutantes a pesar de los esfuerzos dedicados a ello. Por ello, se decidió utilizar una estrategia alternativa basada en el silenciamiento génico. Nuestro grupo ha publicado recientemente un trabajo en el cual se demuestra que el silenciamiento génico es una herramienta útil para atenuar la expresión génica en *F. oxysporum* (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). De hecho las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* utilizadas en este trabajo muestran una excelente correlación entre la reducción de la expresión génica mediada por silenciamiento y la alteración del fenotipo correspondiente (Niño-Sánchez *et al.*, 2016). En consecuencia, decidimos utilizar una estrategia basada en el silenciamiento de uno de los dos genes en un mutante delecionado en el otro gen. Elegimos como fondo genético de partida el mutante $\Delta FHG2$, ya que consideramos que sería más fácil detectar y cuantificar posibles efectos adicionales (aumento de sensibilidad a NO o reducción de porcentaje de germinación) en éste derivados del silenciamiento del gen que tiene un efecto mayor sobre la capacidad de detoxificación de NO.

El análisis de estos transformantes, desafortunadamente, no ha permitido generar resultados concluyentes. Por una parte, el estudio de los datos recogidos y presentados en la figura 59 demuestran que en tres de los cuatro mutantes $\Delta FHG2$ -*FHG1*RNAi, dos derivados de la cepa FOP-SP1 y dos derivados de la cepa FOP-SP4, el silenciamiento de *FHG1* determina un aumento adicional de sensibilidad a NO sobre la manifestada por los mutantes $\Delta FHG2$. En el segundo de los transformantes $\Delta FHG2$ -*FHG1*RNAi analizados en la cepa FOP-SP1 esta reducción adicional no resulta evidente, quizás como consecuencia de variaciones debidas a diferencias en el nivel de silenciamiento del gen *FHG1* de unos transformantes a otros, aunque ciertamente los cuatro transformantes seleccionados fueron aquellos que mostraron un menor nivel de expresión de este gen. Por otra parte, es difícil cuantificar con los datos obtenidos la magnitud del aumento adicional de sensibilidad a NO que determina el silenciamiento de *FHG1* en los mutantes $\Delta FHG2$. Teniendo en cuenta el nivel de sensibilidad determinado en la primera serie de experimentos cuando se evaluó el comportamiento de los mutantes simples, el nivel de sensibilidad estimado ahora

para los transformantes silenciados no es significativamente mayor que el de los mutantes simple $\Delta FHG1$. No obstante, entendemos que el comportamiento de estos transformantes debe ser analizado más en profundidad, incluyendo en los mismos ensayos todas las cepas de interés, incluidas las cepas $\Delta FHG1$ de FOP-SP1 y FOP-SP4, e incrementando el número de medidas para disponer de una estadística más robusta. En este momento, por lo tanto, no podemos ser categóricos, si bien los datos a nuestra disposición sugieren que ambas flavohemoglobinas, FHG1 y FHG2, no actúan de forma sinérgica.

En cualquier caso, es importante destacar los datos obtenidos muestran inequívocamente que en *F. oxysporum* hay dos FHGs cruciales para conferir plena capacidad de detoxificación de NO al microorganismo.

4.5 El papel de FHG1 y FHG2 en la detoxificación de NO evidencia una función del NO sobre germinación.

La evaluación de la capacidad de crecimiento en presencia de un donador de NO de las cepas tipo silvestre y de las cepas mutantes correspondientes demuestra que las flavohemoglobinas en *F. oxysporum* participan en los mecanismos de resistencia a condiciones de estrés nitrosativo. El papel fundamental en esta función fisiológica lo desempeñan las enzimas FHG1 y FHG2, particularmente la enzima FHG1. La pregunta relevante llegados a este punto es: ¿en qué procesos fisiológicos particulares es importante la función de detoxificación de NO que llevan a cabo las enzimas flavohemoglobinas en *F. oxysporum*? Los mutantes analizados en este trabajo tanto en la cepa FOP-SP1 como en la cepa FOP-SP4 no muestran alteraciones morfológicas y de desarrollo evidentes cuando se cultivan en placas de medio sólido en ausencia de un donador de NO, ya sea en presencia de amonio o de nitrato como fuente de nitrógeno. Tampoco se ve afectada la eficiencia de germinación en medio mínimo líquido. Por lo tanto, la eliminación de forma independiente de cada gen *FHG* parece que no condiciona la supervivencia y el desarrollo de *F. oxysporum* en las condiciones analizadas en este trabajo. Esta observación establece una diferencia con algunos sistemas fúngicos, en los que sí se han descrito alteraciones en el crecimiento y desarrollo en mutantes deficientes de los genes codificadores de *FHG*. Así, en *C. albicans* se ha descrito que los mutantes $\Delta Cayhb1$ muestran un desarrollo hiperfilamentoso (Hromatka *et al.*, 2005). En *A. oryzae* mutantes del gen $\Delta Fhb1$ muestran alteraciones morfológicas en el micelio (Te Biesebeke *et al.*, 2010). En *A. oryzae* los mutantes $\Delta Fhb1$ crecen más lentamente con alteraciones en la morfología de las hifas en ausencia de NO (Zhou *et al.*, 2010). En *A. nidulans* los mutantes del gen $\Delta fhbA$ producen

más cuerpos de fructificación (Baidya *et al.*, 2011). No obstante, el estudio del comportamiento de las cepas silvestres y de las cepas mutantes en medio mínimo líquido en presencia de NO sugiere que *FHG1*, y en menor medida *FHG2*, son importantes en *F. oxysporum* para detoxificar el NO que tiene un efecto notable sobre germinación.

Nuestros resultados demuestran que el NO exógeno reduce la eficiencia de germinación de FOP-SP1 y FOP-SP4, lo que supone que éste altera o modula la actividad de componentes esenciales para que se produzca la germinación de las esporas. Nuestros resultados demuestran, además, que en la eliminación de los niveles de NO que afectan a estos componentes juega un papel fundamental *FHG1*, ya que en los mutantes $\Delta FHG1$ lo que en realidad se produce es un bloqueo de la germinación, no un retraso. Este bloqueo se observa en las dos cepas de FOP y en presencia de una u otra fuente de nitrógeno. El hecho de que este bloqueo se produzca en cepas que poseen alelos de tipo silvestre para los otros tres genes *FHG* supone que *FHG1* es responsable específicamente de eliminar el NO que afecta a estos componentes esenciales de la maquinaria de germinación y que su función no es asumida, o compensada, ni siguiera parcialmente, por alguna de las otras tres enzimas *FHG* de *F. oxysporum*. Una situación muy similar ha sido observada recientemente en *B. cinerea*. En este organismo, que sólo posee una enzima flavohemoglobina, BCFGH1, la exposición del tipo silvestre a NO determina un retraso de la germinación. Por su parte, el tratamiento del mutante $\Delta Bcfhg1$ con NO supone un bloqueo absoluto de la germinación (Daniela Santander 2014, Tesis Doctoral). *FHG1* de FOP y BCFGH1 desempeñarían, por lo tanto, una función muy similar en la fisiología de estas dos especies de hongos fitopatógenos.

Debemos destacar en este momento que en un medio mínimo suplementado con nitrato la exposición a NO sí determina una reducción en la eficiencia de germinación en los mutantes $\Delta FHG2$, si bien mucho más moderada que la observada en los mutantes $\Delta FHG1$. *FHG2*, por lo tanto, es responsable de detoxificar un NO que afecta a la germinación, NO que no puede detoxificar *FHG1* y que tiene que ver con el metabolismo del nitrato en los mutantes $\Delta FHG2$. En este contexto es interesante tener en cuenta las observaciones llevadas a cabo en *A. nidulans* (Schinko *et al.*, 2010). Estos autores han proporcionado evidencias de que las flavohemoglobinas *fhbA* y *fhbB* desempeñan un importante papel protector de la actividad nitrato reductasa (NR) frente al daño directo causado por la exposición a NO (o de especies reactivas de nitrógeno derivadas). Es tentador proponer que *FHG2* tenga una actividad detoxificadora de NO semejante a la de *FHG1* en resistencia a estrés nitrosativo (aunque sea *FHG1* la enzima principal implicada), pero que quizás

desempeña una función especializada en la protección de la NR (y quizás también de otras enzimas implicadas en el metabolismo de nitrato) frente a NO. La eliminación de *FHG2* determinaría la desaparición del efecto protector, y, consiguientemente, una reducción de la actividad NR, lo que a su vez resultaría en una menor capacidad de metabolizar nitrato por parte de los mutantes, y por lo tanto una eficiencia menor en la germinación. Esto supondría que la reducción de la germinación observada en los mutantes $\Delta FHG2$ es más bien consecuencia de un problema nutricional y no tanto de un efecto directo del NO sobre componentes esenciales del programa de germinación, que es lo que proponemos que sucede en el caso de los mutantes $\Delta FHG1$, en los que lo que se determina un bloqueo de la germinación que se produce tanto en medio con nitrato como en medio con amonio.

El estudio de los transformantes $\Delta FHG2$, tanto de la cepa FOP-SP1 como de la cepa FOP-SP4, en los que se ha silenciado el gen *FHG1* muestra que, efectivamente, el silenciamiento de *FHG1* determina una reducción adicional de la germinación en relación con la observada en el mutante $\Delta FHG2$, pero ésta no llega a alcanzar los valores de reducción observados en mutante simple $\Delta FHG1$. Esto supone que el silenciamiento logrado en nuestros transformantes no es absoluto y que, efectivamente, la enzima con un papel más importante en la detoxificación del NO que afecta a la germinación es *FHG1*.

4.6 El papel del NO y de las flavohemoglobinas en diferenciación y desarrollo

Este papel “modulador” del NO sobre germinación (modulador porque en la cepa silvestre solo reduce la eficiencia de germinación mientras que en el mutante la bloquea completamente) que observamos en nuestro sistema ha sido descrito en otros hongos filamentosos. Utilizando una aproximación farmacológica basada en la adición de donadores de NO, de inhibidores de la enzima NOS y de secuestradores de formas activas de nitrógeno, Wang y Higgins (2005) presentaron evidencias en *C. coccodes* que sugerían que el NO tiene un efecto regulador sobre la germinación. Una situación muy similar ha sido descrita en *C. graminicola* (Daniela Santander, 2014. Tesis Doctoral). En *B. cinerea*, como comentábamos anteriormente, se han obtenido indicaciones que apuntan en el mismo sentido, en este caso apoyadas sobre evidencias tanto farmacológicas como genéticas (Daniela Santander, 2014. Tesis Doctoral).

Efectivamente, la aproximación farmacológica basada en la adición de NO exógeno ha sido considerada en varios hongos a la hora de investigar la naturaleza de los procesos en los

que el NO tiene un efecto. Los resultados obtenidos sugieren que el NO, también en este grupo de organismos, regula procesos de diferenciación y/o desarrollo, aunque dependiendo de los sistemas, en ocasiones parece ejercer una regulación en sentidos opuestos. Así, se ha demostrado que en *N. crassa* la adición de NO induce la producción de esporas asexuales (Ninnemann and Maier, 1996). En *P. blakesleeanus* regula el desarrollo del esporangióforo (Maier *et al.*, 2001). En *Coniothyrium minitans* induce la conidiación (Gong *et al.*, 2007). En *A. nidulans*, en uno de los estudios más completos al respecto, se ha comprobado recientemente que la exposición a niveles elevados de NO reduce la germinación de las esporas asexuales e induce el desarrollo de las estructuras características de la fase de reproducción sexual, los cleistotecios (Marcos *et al.*, 2016). En *F. oxysporum* nosotros observamos una reducción en la eficiencia de la germinación de las esporas, lo que supone que *F. oxysporum* y *A. nidulans* responden de manera similar a NO exógeno. Dado que *F. oxysporum* no presenta reproducción sexual conocida, la estimulación o no de la producción de estructuras sexuales no ha podido ser evaluada.

Es interesante destacar que la participación del NO en procesos de desarrollo y morfogénesis se ha descrito en distintos sistemas, en particular en plantas (Beligni y Lamattina, 2000; Pagnussat *et al.*, 2002, 2003; He *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Fernández-Marcos *et al.*, 2011; Giudice *et al.*, 2011; Kwon *et al.*, 2012). En el contexto de nuestro trabajo resulta especialmente interesante el trabajo de Wang *et al.* (2012) analizando procesos de desarrollo en la especie vegetal *Camelia sinensis*. Basándose en los resultados obtenidos con un donador de NO estos autores sugieren que el NO retrasa tanto la germinación del grano de polen como el desarrollo del tubo polínico en *C. sinensis*. Esto supone que observamos efectos parecidos del NO en el desarrollo de estructuras similares en especies pertenecientes a grupos taxonómicos muy diferentes, plantas y hongos. Este paralelismo probablemente indique un grado de conservación de los componentes implicados en la formación de dichas estructuras.

La aproximación farmacológica considerada en los estudios que hemos descrito utiliza donadores de NO. En la mayor parte de los sistemas investigados la exposición a NO exógeno determina la inducción de la expresión del gen, o de los genes, *FHG*, como parte de un sistema de defensa inducible frente a estrés nitrosativo. Pero también en la mayor parte de los sistemas vivos se ha demostrado la producción de NO endógeno, en particular en especies de hongos en los que se ha demostrado esta producción tanto mediante la vía oxidativa como mediante la vía reductiva (revisado en Roszer, 2012). El microorganismo debe hacer frente también, indudablemente, al NO producido de forma endógena, haciendo

uso de mecanismos de detoxificación en los que participan las enzimas FHG. El control de los niveles de NO, resultantes de la producción endógena y de la detoxificación por enzimas FHG, permite considerar este control como un mecanismo importante en la regulación de procesos de diferenciación y desarrollo en este grupo de organismos. En este sentido apuntan las observaciones llevadas a cabo en *B. cinerea* y en *A. nidulans*. En el primero se ha demostrado la producción de NO por parte del hongo, aunque no ha sido posible determinar el mecanismo mediante el cual éste es generado (Turrión-Gómez and Benito, 2011). En este sistema la expresión de *Bcfhg1* está regulada durante el desarrollo, mostrando un máximo de expresión coincidente con la germinación en ausencia de NO exógeno (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). *A. nidulans* también produce NO, en este caso mediante un sistema dependiente al menos parcialmente de la actividad NR, y esta producción está regulada durante el desarrollo, aumentando en las fases tempranas de la transición de crecimiento vegetativo a conidiación (Marcos *et al.*, 2016). Es interesante destacar que en *A. nidulans* *niaD* y *fhbA* muestran una inducción transitoria de la expresión durante la inducción de la conidiación. Por su parte, *fhbB* muestra un patrón de expresión diferente caracterizado por una expresión moderada en la fase de inicio de la conidiación y una fuerte inducción en fases más tardías (Marcos *et al.*, 2016). Todo ello sugiere que en este grupo de organismos, representados por *B. cinerea* y *A. nidulans*, el NO endógeno puede condicionar procesos tales como la conidiación o la germinación de las esporas y que éstos son regulados mediante la modulación de los niveles de expresión de los genes codificadores de enzimas FHG que detoxifican el NO. En los sistemas que poseen varios genes FHG esto puede implicar una regulación diferencial de la expresión de unos y otros, y la asunción de papeles o funciones específicas.

F. oxysporum posee, como se demuestra en este trabajo, cuatro genes codificadores de FHG, los cuales muestran patrones de expresión diferentes. En el curso de este trabajo hemos obtenido, utilizando procedimientos basados en microscopía de fluorescencia, unas primeras evidencias de que *F. oxysporum* también produce NO (resultados no mostrados). Todas estas observaciones contribuyen a dibujar el comportamiento de un hongo muy “versátil” desde un punto de vista metabólico, que puede crecer tanto en amonio como en nitrato en condiciones de aerobiosis, que también puede desarrollarse en condiciones de denitrificación y crecer en anaerobiosis, y que puede resultar expuesto a posibles fuentes internas y externas de NO. La disponibilidad de distintas enzimas FHG puede conferir ventajas adaptativas en condiciones ambientales y de acceso a nutrientes muy diversas.

4.7 El papel de los genes *FHG* durante la interacción con el huésped

El análisis de expresión de los genes *FHG* de *F. oxysporum in planta* demuestra que los niveles de expresión de los genes *FHG2*, *FHG3* y *FHG4* son muy estables a lo largo del proceso de infección en los tiempos considerados en nuestro estudio, desde 1 dpi hasta 14 dpi. Sólo en el caso del gen *FHG1* se detectan variaciones significativas en el nivel de expresión, que aumenta a lo largo del tiempo (del progreso de la infección), triplicando su nivel de expresión a 7 dpi. La situación es muy similar en ambas cepas. Dado que éstas difieren significativamente en la virulencia frente a plantas de judía, no parece que la expresión de los genes *FHG* esté correlacionada con la virulencia exhibida durante la colonización del huésped.

Como hemos comprobado en este trabajo, *FHG1* responde a nivel transcripcional de forma específica a la exposición a NO durante el cultivo en medios sintéticos. Teniendo en cuenta esta observación es posible proponer que durante la interacción tanto de la cepa FOP-SP1 como de la cepa FOP-SP4 de *F. oxysporum* con su huésped, el patógeno debe resultar expuesto a NO. Aunque no puede descartarse que el patógeno pueda producir por sí mismo NO a niveles superiores en respuesta a algún tipo de estímulo de la planta durante la interacción con ésta, parece razonable asumir que es la propia planta la que produce NO como consecuencia de la activación de los mecanismos de defensa, en el curso de los cuales se producen y liberan cantidades importantes de AOS y RNS (Delledone *et al.*, 1998; Delledone *et al.*, 2001) a los que el hongo resultará expuesto. En esta situación, y dada la toxicidad del NO sobre los microorganismos, la eliminación de componentes importantes en la detoxificación de NO bien podría determinar una reducción de la capacidad de desarrollo del patógeno *in planta* con la consiguiente reducción de virulencia. Esta situación ha sido descrita en algunas interacciones planta-patógeno (Favey *et al.*, 1995; Boccara *et al.*, 2005) y también en algunas interacciones en las que participan microorganismos patógenos de la especie humana (Crawford and Goldberg, 1998; de Jesús-Barrios *et al.*, 2003; Ullmann *et al.*, 2004). En *F. oxysporum*, el trabajo descrito en esta memoria demuestra que la eliminación de *FHG1*, al igual que la de los otros tres genes *FHG*, no determina reducción de la capacidad de infección de ninguna de las dos estirpes analizadas. Tampoco se observa reducción de virulencia en los mutantes Δ *FHG2* en los que se ha silenciado el gen *FHG1*. Es posible concluir, por lo tanto, que los genes *FHG* no son factores de patogenicidad en FOP. Esta es una situación descrita recientemente en distintos sistemas en los que a priori se suponía un papel importante de las enzimas de tipo flavohemoglobina como factores de patogenicidad. Por ejemplo, en *B. cinerea* los

mutantes deficientes en el gen *Bcfhg1*, único gen codificador de una enzima flavohemoglobina en este hongo necrótrofo, son hipersensibles a NO pero no muestran una reducción en su patogenicidad ni virulencia (Turrión-Gómez *et al.*, 2010). En *A. fumigatus* los mutantes deficientes en los genes codificadores de enzimas flavohemoglobina muestran la misma agresividad en sistemas modelo de infección (ratones) que la cepa tipo silvestre (Lapp *et al.*, 2014). Estas observaciones, que provienen de sistemas muy diferentes, proporcionan evidencias que contradicen, al menos en parte, la visión más clásica de la interacción, según la cual el microorganismo sufre una situación de estrés nitrosativo, además de estrés oxidativo, durante su interacción con el huésped. En el caso de FOP, el hecho de que los mutantes ΔFHG infecten a su huésped de igual manera que las cepas tipo silvestre supone que, o bien los niveles de NO producidos durante la interacción no son lo suficientemente elevados como para determinar una limitación en su crecimiento *in planta*, o bien que *F. oxysporum* dispone de otros sistemas de detoxificación de NO.

5 CONCLUSIONES

- Las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4 de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* poseen cuatro genes codificadores de enzimas de tipo flavohemoglobina, *FHG1*, *FHG2*, *FHG3* y *FHG4*. Son cuatro genes de copia única y carecen de intrones. Las proteínas codificadas presentan la organización en dominios funcionales característica de las enzimas de tipo flavohemoglobina. El análisis bioinformático indica que *FHG1*, *FHG2* y *FHG3* son proteínas de localización citoplasmática mientras que *FHG4* es una proteína de localización mitocondrial.
- El patrón de expresión de los genes *FHG* en relación con los factores “estado de desarrollo”, “fuente de nitrógeno” y “exposición a NO”, es específico de cada gen y similar en ambas cepas.
- *FHG1*, y en menor medida *FHG2*, incrementan sus niveles de expresión durante la germinación de las esporas en respuesta a la exposición a NO. La expresión de *FHG2* está regulada, además, por la fuente de nitrógeno y el estado de desarrollo. La regulación de la expresión de *FHG3* es compleja, pero no resulta obvia, en general, una regulación por exposición a NO. *FHG4* no responde a nivel transcripcional a ninguno de los factores evaluados en nuestro análisis.
- El nivel de expresión de *FHG1* aumenta a medida que progresa la infección, tanto en la interacción de plantas de judía FOP-SP1 como en la interacción con la estirpe FOP-SP4. El nivel de expresión de los genes *FHG2*, *FHG3* y *FHG4* no varía a lo largo del proceso de infección.
- Los mutantes simples deficientes en cada uno de los genes *FHG* de las estirpes FOP-SP1 y FOP-SP4 no muestran ninguna alteración evidente que afecte a su capacidad de crecimiento en medios de cultivo artificiales o a su desarrollo.
- Las flavohemoglobinas *FHG1* y *FHG2*, pero no las flavohemoglobinas *FHG3* y *FHG4*, son esenciales para proporcionar los niveles de resistencia frente a condiciones de estrés nitrosativo mostrados por las estirpes silvestres FOP-SP1 y FOP-SP4. .

- La exposición a NO en FOP-SP1 y en FOP-SP4 determina un retraso en la germinación de los microconidios. La caracterización funcional de los mutantes ΔFHG demuestra que FHG1 es la flavohemoglobina que desempeña una función principal en la eliminación del NO que afecta a la germinación de las esporas.
- Las flavohemoglobinas codificadas por los genes analizados en este trabajo no constituyen factores de virulencia en *F. oxysporum*.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. M., & Cory, S. 2002. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology* 14(6):715-720.
- Agrios, G.N. 1997. Plant pathology, 4th edn. San Diego, CA, USA: Academic Press Ltd.
- Akagi, Y., Akamatsu, H., Otani, H., & Kodama, M. 2009. Horizontal chromosome transfer, a mechanism for the evolution and differentiation of a plant-pathogenic fungus. *Eukaryotic Cell* 8(11):1732-1738.
- Alderton, W. K., Cooper, C. H., & Knowles, R. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemistry Journal* 357:593-615.
- Aloj, B., Maziano, F., Zoina, A. & Noviello, C. 1983. La tracheofusariosi del fagiolo in Italia. *Informatore Fitopatologico* 11: 63-66.
- Aloj, B., Marziano, F., Zoina, A. and Noviello, C. 1987. Osservazioni su una nuova razza fisiologica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. "Annali" della FAcoltà di Scienze Agrarie dell'Università di Napoli in Portici. Serie IV, vol. XXI, pp. 51-55.
- Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., Eslava, A. P., & Díaz-Mínguez, J. 1999. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* Strains from Common Bean Fields in Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3335-3340.
- Alves-Santos, F. M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J. M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M. C., & Eslava, A. P. 2002a. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology* 51(5):605-611.
- Alves-Santos, F. M., Ramos, B., García-Sánchez, M. A., Eslava, A. P., & Díaz-Mínguez, J. M. 2002b. A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology* 92(3):237-244.
- Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davis, M. A., & Hynes, M. J. 1998. Characterization of the *Aspergillus nidulans* *nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *Journal of Bacteriology* 180(7):1973-1977.
- Appel, D. J., & Gordon, T. R. 1995. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Experimental Mycology* 19(2):120-128.
- Arasimowicz-Jelonek, M., & Floryszak-Wieczorek, J. 2014. Nitric oxide: an effective weapon of the plant or the pathogen. *Molecular Plant Pathology* 15(4):406-416.
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J., Cigelnik, E., Kroon, L. P., Roebroek, E. J., & Waalwijk, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90(8):891-900.

- Baidya, S., Cary, J. W., Grayburn, W. S., & Calvo, A. M. 2011. Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology* 77(15): 5524-5528.
- Bang, I. S., Liu, L., Vazquez-Torres, A., Crouch, M. L., Stamler, J. S., & Fang, F. C. 2006. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin hmp gene. *Journal of Biological Chemistry* 281(38): 28039-28047.
- Beckman, C.H. 1987. *The nature of wilt diseases of plants. American Phytopathological Society*. EEUU.
- Belenghi, B., Romero-Puertas, M. C., Vercammen, D., Brackenier, A., Inzé, D., Delledonne, M., & Van Breusegem, F. 2007. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* 282(2): 1352-1358.
- Beligni, M. V. & Lamattina, L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210(2): 215-21.
- Benlloch, M, Cañizo JD. 1926. La enfermedad de las alubias en barco de ávila. *Boletín de la Estación de Patología Vegetal* 1: 2-7.
- Berger, H., Basheer, A., Böck, S., Reyes-Dominguez, Y., Dalik, T., Altmann, F., & Strauss, J. 2008. Dissecting individual steps of nitrogen transcription factor cooperation in the *Aspergillus nidulans* nitrate cluster. *Molecular Microbiology* 69(6): 1385-1398.
- Bernreiter, A., Ramón, A., Fernández-Martínez, J., Berger, H., Araújo-Bazan, L., Espeso, E. A., & Strauss, J. 2007. Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology* 27(3): 791-802.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., & Wendehenne, D. 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review Plant Biology* 59: 21-39.
- Bethke, P. C., Gubler, F., Jacobsen, J. V., & Jones, R. L. 2004. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Plant Journal* 219(5): 847-855.
- Boccara, M., Mills, C.E., Zeier, J., Anzi, C., Lamb, C., Poole, R.K., & Delledonne, M. 2005. Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. *The Plant Journal* 43:226-37.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., & Lipton, S.A. 1995. Apoptosis and necrosis - 2 distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Science of the U. S. A.* 92:7162-7166.
- Booth, C., Moss, M. O., & Smith, J. E. 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. In *The Applied Mycology of Fusarium. Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College, London, September 1982.* (pp. 1-13). Cambridge University Press.

- Boveris, A., Costa, L. E., Poderoso, J. J., Carreras, M. C., & Cadenas, E. 2000. Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899(1): 121-135.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S., & Neill, S. J. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* 45(1): 113-122.
- Buisson, N., & Labbe-Bois, R. 1998. Flavohemoglobin Expression and Function in *Saccharomyces cerevisiae* NO relationship with respiration and complex response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 273(16): 9527-9533.
- Burnett, J. H. 1984. Aspects of *Fusarium* genetics. The Applied Mycology of *Fusarium* In pp. 39-69. Held at Queen Mary Collage of London.
- Cadenas, E., & Davies, K. J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* 29(3): 222-230.
- Cañero, D. C., & Roncero, M. I. G. 2008. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98(5): 509-518.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., & Werner, T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21(13): 2933-2942.
- Cassanova, N., O'Brien, K. M., Stahl, B. T., McClure, T., & Poyton, R. O. 2005. Yeast Flavohemoglobin, a Nitric Oxide Oxidoreductase, Is Located in Both the Cytosol and the Mitochondrial Matrix effects of respiration, anoxia, and the mitochondrial genome on its intracellular level and distribution. *Journal of Biological Chemistry* 280(9): 7645-7653.
- Cevahir, G., Aytamka, E., & Erol, Ç. 2007. The role of nitric oxide in plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 21(1): 13-17.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnais, S., & Picard, M. 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(4): 411-428.
- Corker, H., & Poole, R. K. 2003. Nitric oxide formation by *Escherichia coli* dependence on nitrite reductase, the no-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. *Journal of Biological Chemistry* 278(34): 31584-31592.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., & del Río, L. A. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6(4): 145-150.
- Courtois, C., Besson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A., & Wendehenne, D. 2008. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *Journal of Experimental Botany* 59(2): 155-163.
- Cove, D. J. 1979. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biological Reviews* 54(3): 291-327.

- Chichkova, N.V., Kim, S.H., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubtsov, Y.P., Kalinina, N.O., Talianky, M.E., & Vartapetian, A.B. 2004. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* 16: 157-171.
- Cramm, R., Siddiqui, R. A., & Friedrich, B. 1994. Primary sequence and evidence for a physiological function of the flavohemoprotein of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Biological Chemistry* 269(10): 7349-7354.
- Crawford, M. J., & Goldberg, D. E. 1998b. Role for the *Salmonella flavohemoglobin* in protection from nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 273(20): 12543-12547.
- Crawford, M. J., & Goldberg, D. E. 1998a. Regulation of the *Salmonella typhimurium* Flavohemoglobin Gene a new pathway for bacterial gene expression in response to nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 273(51): 34028-34032.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, S., & Golvano, M. P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters* 398(2): 159-164.
- Czymmek, K. J., Fogg, M., Powell, D. H., Sweigard, J., Park, S. Y., & Kang, S. 2007. In vivo time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 44(10): 1011-1023.
- Daboussi, M. J., & Capy, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1): 275-299.
- de Jesús-Berríos, M., Liu, L., Nussbaum, J. C., Cox, G. M., Stamler, J. S., & Heitman, J. 2003. Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Current Biology* 13(22): 1963-1968.
- de Vega-Bartol, J. J., Tello, V., Niño, J., Casado, V., & Díaz-Mínguez, J. M. 2013. Quantitative PCR Analysis of Double-Stranded RNA-Mediated Gene Silencing in Fungi. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 279-287). Springer New York
- de Vega-Bartol, J. J., Martín-Dominguez, R., Ramos, B., García-Sánchez, M. A., & Díaz-Mínguez, J. M. 2011. New virulence groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*: the expression of the gene coding for the transcription factor *ftf1* correlates with virulence. *Phytopathology* 101(4): 470-479.
- Deighton, F. C., Stevenson, J. A., & Cummins, G. B. 1962. Formae speciales and the code. *International Association for Plant Taxonomy* 11(3): 70-71.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394(6693): 585-8.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 98(23): 13454-9.

- Di Pietro, A. D., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology* 4(5): 315-325.
- Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Meglecz, E., & Roncero, M. I. G. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology* 39(5): 1140-1152.
- Díaz-Mínguez, J. M., Alves-Santos, F. M., Benito, E. P., & Eslava, A. P. 1996. *Fusarium* wilt of common bean in the Castilla y Leon region of Spain. *Plant Disease* 80(5): 600.
- Dunn-Coleman, N. S., Tomsett, A. B., & Garrett, R. H. 1981. The regulation of nitrate assimilation in *Neurospora crassa*: biochemical analysis of the nmr-1 mutants. *Molecular and General Genetics MGG* 182(2): 234-239.
- Durner, J., & Klessig, D. F. 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2(5): 369-374.
- Ermiler, U., Siddiqui, R. A., Cramm, R., & Friedrich, B. 1995. Crystal structure of the flavohemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution. *The EMBO Journal* 14(24): 6067.
- Favey, S., Labesse, G., Vouille, V., & Boccard, M. 1995. Flavohaemoglobin HmpX: a new pathogenicity determinant in *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Microbiology* 141(4): 863-871.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B. W., Wang, Y., Pallas, J. A., & Loake, G. J. 2005. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 102(22): 8054-8059.
- Fernández-Marcos, M., Sanz, L., Lewis, D. R., Muday, G. K., & Lorenzo, O. 2011. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 108(45): 18506-18511.
- Fitzhugh, A. L., & Keefer, L. K. 2000. Diazeniumdiolates: Pro-and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radical Biology and Medicine* 28(10): 1463-1469.
- Frandsen, R. J., Andersson, J. A., Kristensen, M. B., & Giese, H. 2008. Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi. *BMC Molecular Biology* 9(1): 1.
- Freschi, L., Rodrigues, M. A., Domingues, D. S., Purgatto, E., Van Sluys, M. A., Magalhaes, J. R., & Mercier, H. 2010. Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiology* 152(4): 1971-1985.
- García-Martínez, J., Ádam, A. L., & Avalos, J. 2012. Adenylyl cyclase plays a regulatory role in development, stress resistance and secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *PloS One* 7(1): e28849.

- Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., & Salzman, A.L. 1998. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 95:10378-83.
- Gardner, P. R. 2005. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(1): 247-266.
- Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, A. & O'Donnell, K. 2004. *Fusarium-ID v. 1.0*: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479.
- Gepts, P., & Bliss, F. A. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Economic Botany* 42(1): 86-104.
- Gerlach, W. & Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium*, a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. 406.
- Gilberthorpe, N. J., & Poole, R. K. 2008. Nitric Oxide Homeostasis in *Salmonella typhimurium* roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 283(17): 11146-11154.
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., & André, B. 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 27(8): 3065-3086.
- Gong, X., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Yi, X., & Peng, Y. 2007. L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genetics and Biology* 44(12): 1368-1379.
- Gordon, T. R., & Martyn, R. D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology* 35(1): 111-128.
- Glass, N. L., Jacobson, D. J., & Shiu, P. K. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual review of genetics* 34(1): 165-186.
- Guadet, J., Julien, J., Lafay, J. F., & Brygoo, Y. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Molecular Biology and Evolution* 6(3): 227-242.
- Hagedorn, D. J. 1991. Compendium of bean diseases. Hall, R. (Ed). *APS Press*, pp. 20.
- Han, Y., Liu, X., Benny, U., Kistler, H. C., & VanEtten, H. D. 2001. Genes determining pathogenicity to pea is clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *The Plant Journal* 25(3): 305-314.
- Hausladen, A., Gow, A. J., & Stamler, J. S. 1998. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 95(24): 14100-14105.

- He, Y., Tang, R. H., Hao, Y., Stevens, R. D., Cook, C. W., Ahn, S. M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R. B., Crawford, N. M., & Pei, Z. M. 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305(5692): 1968-71.
- Heidmann, S., Obermaier, B., Vogel, K., & Domdey, H. 1992. Identification of pre-mRNA polyadenylation sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 267: 4215-4229.
- Hernández-Urzúa, E., Mills, C. E., White, G. P., Contreras-Zentella, M. L., Escamilla, E., Vasudevan, S. G., & Poole, R. K. 2003. Flavohemoglobin Hmp, but not its individual domains, confers protection from respiratory inhibition by nitric oxide in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 278(37): 34975-34982.
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6(2): 150-166.
- Hromatka, B.S., Noble, S.M., y Johnson, A.D. 2005. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. *Journal of Biological Chemistry* 280: 4814-4826.
- Houterman, P. M., Ma, L., Van Ooijen, G., De Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J., Takken, F. L., & Rep, M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal* 58(6): 970-978.
- Ignarro, L. J. 1990. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 30(1): 535-560.
- Napoli, C., & Ignarro, L. J. 2009. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Archives of Pharmacal Research* 32(8): 1103-1108.
- Iijima, M., Shimizu, H., Tanaka, Y., & Urushihara, H. 2000. Identification and characterization of two flavohemoglobin genes in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Structure and Function* 25(1): 47-55.
- Ilari, A., Bonamore, A., Farina, A., Johnson, K. A., & Boffi, A. 2002. The X-ray Structure of Ferric *Escherichia coli* Flavohemoglobin Reveals an Unexpected Geometry of the Distal Heme Pocket. *Journal of Biological Chemistry* 277(26): 23725-23732.
- Imazaki, I., Kurahashi, M., Iida, Y., & Tsuge, T. 2007. Fow2, a Zn (II) 2Cys6-type transcription regulator, controls plant infection of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology* 63(3): 737-753.
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C. G., & Puntarulo, S. 2006. Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology* 142(3): 1246-1255.
- Jonkers, W., Xayamongkhon, H., Haas, M., Olivain, C., Does, H. C., Broz, K., & Kistler, H. C. 2014. EBR1 genomic expansion and its role in virulence of *Fusarium* species. *Environmental Microbiology* 16(7): 1982-2003.

- Kaiser, W. M., Gupta, K. J., & Planchet, E. 2006. Higher plant mitochondria as a source for NO. In *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology* (pp. 1-14). Springer Berlin Heidelberg.
- Kanadia, R. N., Kuo, W. N., McNabb, M., & Botchway, A. 1998. Constitutive nitric oxide synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life* 45(6): 1081-1087.
- Kazan, K., Gardiner, D. M., & Manners, J. M. 2012. On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 399-413.
- Kendrick, J. B. & Snyder, W. C. 1942. *Fusarium* yellows of beans. *Phytopathology* 32: 1010-1014.
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B., & Hornok, L. 2004. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8): 4419-4423.
- Keszthelyi, A., Jeney, A., Kerényi, Z., Mendes, O., Waalwijk, C., & Hornok, L. 2007. Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(4): 373-391.
- Kistler, H. C. 2001. Evolution of host specificity in *Fusarium oxysporum*. In: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse WL, Burgess LW, editors. *Fusarium: Paul E Nelson Memorial Symposium*. St. Paul: APS Press. pp. 70–82.
- Kistler, H. C., Benny, U., Boehm, E. W. A., & Katan, T. 1995. Genetic duplication in *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 28(2): 173-176.
- Knogge, W. 1996. Molecular basis of specificity in host/fungus interactions. *European Journal of Plant Pathology* 102(9): 807-816.
- Kobayashi, M., & Shoun, H. 1995. The copper-containing dissimilatory nitrite reductase involved in the denitrifying system of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biological Chemistry* 270(8): 4146-4151.
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N. M., Bennett, C. F., Sibley, S., & Arst Jr, H. N. 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO Journal* 9(5): 1355.
- Kuo, P. C., & Schroeder, R. A. 1995. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Annals of Surgery* 221(3): 220.
- Kwon, E., Feechan, A., Yun, B. W., Hwang, B. H., Pallas, J. A., Kang, J. G., & Loake, G. J. 2012. AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in Arabidopsis. *Plant Journal* 236(3): 887-900.
- LaCelle, M., Kumano, M., Kurita, K., Yamane, K., Zuber, P., & Nakano, M. M. 1996. Oxygen-controlled regulation of the flavohemoglobin gene in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 178(13): 3803-3808.
- Laday, M., & Szecsi, A. 2002. Identification of *Fusarium* species by isozyme analysis. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49(2-3): 321-330.

- Lapp, K., Vödisch, M., Kroll, K., Strassburger, M., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., & Brakhage, A. A. 2014. Characterization of the *Aspergillus fumigatus* detoxification systems for reactive nitrogen intermediates and their impact on virulence. *Frontiers in Microbiology* 5:469.
- Lazo, G.R., Stein, P.A. & Ludwig, R.A. 1991. A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Biotechnology* 9: 963-7.
- Lee, J., Myong, K., Kim, J. E., Kim, H. K., Yun, S. H., & Lee, Y. W. 2012. FgVelB globally regulates sexual reproduction, mycotoxin production and pathogenicity in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Microbiology* 158(7): 1723-1733.
- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B. O., Feelisch, M., & Vierling, E. 2008. Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 20(3): 786-802.
- Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31:127-150.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual (Vol. 2, No. 10). Ames, IA, USA: Blackwell Pub.
- Levasseur, A., Orlando, L., Bailly, X., Milinkovitch, M. C., Danchin, E. G., & Pontarotti, P. 2007. Conceptual bases for quantifying the role of the environment on gene evolution: the participation of positive selection and neutral evolution. *Biological Reviews* 82(4): 551-572.
- Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Xie, J., Cheng, J., Li, G., & Yi, X. 2010. Cyclic GMP as a second messenger in the nitric oxide-mediated conidiation of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(9): 2830-2836.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A. C., Levesque, C. A., Cammue, B. P. & Thomma, B. P. 2003. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 223: 113-122.
- Liu, J., & Zuber, P. 2000. The ClpX protein of *Bacillus subtilis* indirectly influences RNA polymerase holoenzyme composition and directly stimulates σ H-dependent transcription. *Molecular Microbiology* 37(4): 885-897.
- Lombardo, Graziano, M., Polacco, J. C., & Lamattina, L. 2006. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behavior* 1(1): 28-33.
- López-Berges, M. S., Rispail, N., Prados-Rosales, R. C., & Di Pietro, A. 2010. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell* 22(7): 2459-2475.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F. & Kazan, K. 2013. *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology* 67: 399-416.
- Ma, L. J., Van Der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., & Houterman, P. M. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464(7287): 367-373.

- MacMicking, J. D., North, R. J., La Course, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K., & Nathan, C. F. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 94(10): 5243-5248.
- Magasanik, B. 1992. Regulation of Nitrogen Utilization. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 21: 283-317.
- Magasanik, B. 2005. The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 102(46): 16537-16538.
- Magasanik, B., & Kaiser, C. A. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290(1-2): 1-18.
- Maier, J., Hecker, R., Rockel, P., & Ninnemann, H. 2001. Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*. *Plant Physiology* 126: 1323-1330.
- Mannick, J. B., & Schonhoff, C. M. 2002. Nitrosylation: the next phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 408(1): 1-6.
- Marchler-Bauer, A. 2015, CDD: NCBI conserved domain database. *Nucleic Acids Research* 43:222-6.
- Martín-Urdíroz, M., Roncero, M. I. G., González-Reyes, J. A., & Ruiz-Roldán, C. 2008. ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* 7(1): 112-121.
- Marcos, A. T., Ramos, M. S., Marcos, J. F., Carmona, L., Strauss, J., & Cánovas, D. 2016. Nitric oxide synthesis by nitrate reductase is regulate during development in *Aspergillus*. *Molecular Microbiology* 99(1): 15-33.
- Martin, S. J., & Green, D. R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. *Cell* 82(3): 349-352.
- Marzluf, G. A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(1): 17-32.
- Membrillo-Hernández, J., Coopamah, M. D., Anjum, M. F., Stevanin, T. M., Kelly, A., Hughes, M. N., & Poole, R. K. 1999. The flavohemoglobin of *Escherichia coli* confers resistance to a nitrosating agent, a "nitric oxide releaser," and paraquat and is essential for transcriptional responses to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 274(2): 748-754.
- Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., Kaiser, W. M., & Lillo, C. 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game. *Photosynthesis Research* 83(2): 181-189.
- Michaelis, T. E. 1991. Compendium of Bean Diseases. *APS Press*.
- Michielse, C. B., & Rep, M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10(3): 311-324.

- Minehart, P. L., & Magasanik, B. O. R. I. S. 1991. Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Molecular and Cellular Biology* 11(12): 6216-6228.
- Mirete, S., Patino, B., Vázquez, C., Jiménez, M., Hinojo, M. J., Soldevilla, C., & González-Jaén, M. T. 2003. Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *International Journal of Food Microbiology* 89(2): 213-221.
- Moncada, S., Rees, D. D., Schulz, R., & Palmer, R. M. 1991. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 88(6): 2166-2170.
- Moore, C.M., Nakano, M.M., Wang, T., Ye, R.W., & Helmann, J.D. 2004. Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *Journal Bacteriology* 186: 4655-4664.
- Booth, C., Moss, M. O., & Smith, J. E. 1984. The Fusarium problem: historical, economic and taxonomic aspects. In *The applied mycology of Fusarium. Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College, London, September 1982*. (pp. 1-13). Cambridge University Press.
- Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M., & Kang, S. 2001. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91(2): 173-180.
- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59(3): 501-520.
- Nakanishi, Y., Zhou, S., Kim, S. W., Fushinobu, S., Maruyama, J. I., Kitamoto, K., & Shoun, H. 2010. A eukaryotic copper-containing nitrite reductase derived from a NirK homolog gene of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 74(5): 984-991.
- Namiki, F., Matsunaga, M., Okuda, M., Inoue, I., Nishi, K., Fujita, Y., & Tsuge, T. 2001. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(4): 580-584.
- Napoli, C., & Ignarro, L. J. 2009. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Archives of Pharmacal Research* 32(8): 1103-1108.
- Narendja, F., Goller, S. P., Wolschek, M., & Strauss, J. 2002. Nitrate and the GATA factor AreA are necessary for in vivo binding of NirA, the pathway-specific transcriptional activator of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 44(2): 573-583.
- Neill, S. J., Desikan, R., & Hancock, J. T. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* 159(1): 11-35.
- Nelson, P. E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In vascular wilt, host plants, soils, nematode interactions. Academic Press.

- Nelson, P. E., Desjardins, A. E., & Plattner, R. D. 1996. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual review of phytopathology* 31(1): 233-252.
- Nelson, P. E., Dignani, M. C., & Anaissie, E. J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7(4): 479-504.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification, Pennsylvania State University Press.
- Ninnemann, H. & Maier, J. 1996. "Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*." *Photochemistry and Photobiology* 64(2): 393-8.
- Niño-Sánchez, J., Casado-del Castillo, V., Tello, V., de Vega-Bartol, J. J., Ramos, B., Sukno, S. A., & Díaz Mínguez, J. M. 2016. The FTF gene family regulates virulence and expression of SIX effectors in *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*.
- Niño-Sánchez, J., Tello, V., Casado-del Castillo, V., Thon, M. R., Benito, E. P., & Díaz-Mínguez, J. M. 2015. Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology* 6: 234
- O'Donnell, K. 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 92: 919-938.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. & Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 95:2044-2049.
- O'Donnell, K., Sarver, B. A., Brandt, M., Chang, D. C., Noble-Wang, J., Park, B. J., & Geiser, D. M. 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated US keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology* 45(7): 2235-2248.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Magnon, K. C., Cox, P. A., Revankar, S. G., & Padhye, A. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* 42(11): 5109-5120.
- Olivain, C., & Alabouvette, C. 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytologist* 141(3): 497-510.
- Ortoneda M., Guarro, J., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Mayayo, E., & Di Pietro, A. 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and Immunity* 72(3): 1760-1766.

- Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., & Lamattina, L. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Molecular Plant Pathology* 129(3): 954-6.
- Pareja-Jaime, Y., Roncero, M. I. G., & Ruiz-Roldán, M. C. 2008. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(6): 728-736.
- Pareja-Jaime, Yolanda., Martín-Urdíroz, Magdalena., Roncero, Mig., González-Reyes, J. A., & Roldán, M. D. C. R. 2010. Chitin synthase-deficient mutant of *Fusarium oxysporum* elicits tomato plant defence response and protects against wild-type infection. *Molecular Plant Pathology* 11(4): 479-493.
- Pastor-Corrales, M. A., & Abawi, G. S. 1987. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Plant Disease* 71(11): 990-993.
- Perazzolli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M. C., Zago, E., Zeier, J., Sonoda, M. & Delledonne, M. 2004. *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *The Plant Cell* 16(10): 2785-2794.
- Pérez-Nadales, E., & Di Pietro, A. 2011. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* 23(3): 1171-1185.
- Ploetz, R. C., Trec, Ifas and Correll, J. C. 1988. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Plant Disease* 72(4): 325-328.
- Poole, R. K., & Hughes, M. N. 2000. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Molecular Microbiology* 36(4): 775-783.
- Poole, R. K., Ioannidis, N., & Orii, Y. 1994. Reactions of the *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp) with oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide: evidence for oxygen switching of flavin oxidoreduction and a mechanism for oxygen sensing. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 255(1344): 251-258.
- Poole, R.K., Anjum, M.F., Membrillo-Hernandez, J., Kim, S.O., Hughes, M.N., & Stewart, V. 1996. Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of hmp (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal Bacteriology* 178: 5487-92.
- Prats, E., Carver, T. L., & Mur, L. A. 2008. Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. *Research in Microbiology* 159(6): 476-480.
- Price D. 1984. *Fusarium* and plant pathology: the reservoir of infection. pp. 71-93 In: Moss MO, Smith JE. (eds.) *The applied mycology of Fusarium*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26(7): 1641-1650.
- Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* based on vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179-183.

- Ramos, B., Alves-Santos, F. M., García-Sánchez, M. A., Martín-Rodrigues, N., Eslava, A. P., & Díaz-Mínguez, J. M. 2007. The gene coding for a new transcription factor (ftf1) of *Fusarium oxysporum* is only expressed during infection of common bean. *Fungal Genetics and Biology* 44(9): 864-876.
- Ribeiro, R. D. L., & Hagedorn, D. J. 1979. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean yellows. *Phytopathology* 69(3): 272-276.
- Ribeiro, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, W., & Martins, I.S. 1999. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters* 445:283-286.
- Rispail, N., & Di Pietro, A. 2009. *Fusarium oxysporum* Ste12 controls invasive growth and virulence downstream of the Fmk1 MAPK cascade. *Molecular Plant-microbe Interactions* 22(7): 830-839.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., & Kaiser, W. M. 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany* 53(366): 103-110.
- Rodriguez-Galvez, E., & Mendgen, K. 1995. Cell wall synthesis in cotton roots after infection with *Fusarium oxysporum*. *Planta* 197(3): 535-545.
- Romero-Puertas, M. C., Laxa, M., Mattè, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A. M., & Delledonne, M. 2007. S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell* 19(12): 4120-4130.
- Roszer, T. 2012. *The biology of subcellular nitric oxide*. London. Heidelberg, Springer.
- Salgado, M. O., & Schwartz, H. F. 1993. Physiological specialization and effects of inoculum concentration of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* on common beans. *Plant Disease* 77(5): 492-496.
- Samalova, M., Johnson, J., Illes, M., Kelly, S., Fricker, M., & Gurr, S. 2013. Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection. *New Phytologist* 197(1): 207-222.
- Samolski, I., de Luis, A., Vizcaíno, J. A., Monte, E., & Suárez, M. B. 2009. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiology* 9(1): 217.
- Samuels, G. J., & Blackwell, M. 2001. Pyrenomycetes fungi with perithecia. In *Systematics and Evolution* (pp. 221-255). Springer Berlin Heidelberg.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning (Vol. 2, pp. 14-9). New Yor. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santander, D. 2014. Estudio del metabolismo del óxido nítrico (NO) en *Botrytis cinerea*: mecanismos de producción y efectos fisiológicos. Tesis Doctoral.
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., & Loscalzo, J. 1992. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization

- of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 89(1): 444-448.
- Sarver, A., & DeRisi, J. 2005. Fzf1p regulates an inducible response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 16(10): 4781-4791.
- Simontacchi, M., Jasid, S., & Puntarulo, S. 2004. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science* 167(4): 839-847.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98(3): 503-517.
- Schäfer, W. 1994. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annual Review of Phytopathology* 32: 461-477.
- Schäfer, K., Di Pietro, A., Gow, N. A., & MacCallum, D. 2014. Murine model for *Fusarium oxysporum* invasive fusariosis reveals organ-specific structures for dissemination and long-term persistence. *PloS one* 9(2): e89920.
- Stajich, J. E., Harris, T., Brunk, B. P., Brestelli, J., Fischer, S., Harb, O. S., & Stoeckert, C. J. 2012. FungiDB: an integrated functional genomics database for fungi. *Nucleic Acids Research* 40(D1): D675-D681.
- Knogge, W. (1996). Fungal infection of plants. *The Plant Cell* 8(10): 1711.
- Schinko, T., Berger, H., Lee, W., Gallmetzer, A., Pirker, K., Pachlinger, R. & Strauss, J. 2010. Transcriptome analysis of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans* reveals connections to nitric oxide metabolism. *Molecular Microbiology* 78(3): 720-738.
- Schinko, T., Gallmetzer, A., Amillis, S., & Strauss, J. 2013. Pseudo-constitutivity of nitrate-responsive genes in nitrate reductase mutants. *Fungal Genetics and Biology* 54: 34-41.
- Seifert, K. A., & Gams, W. 2001. The taxonomy of anamorphic fungi. In *Systematics and Evolution* (pp. 307-347). Springer Berlin Heidelberg.
- Seifert, K. A., & Levesque, C. A. 2004. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* (pp. 449-471). Springer Netherlands.
- Shoun, H., Kim, D. H., Uchiyama, H., & Sugiyama, J. 1992. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Letters* 94(3): 277-281.
- Smagghe, B. J., Trent III, J. T., & Hargrove, M. S. 2008. NO dioxygenase activity in hemoglobins is ubiquitous in vitro, but limited by reduction in vivo. *PloS one* 3(4): e2039.
- Song, N. K., Jeong, C.S., & Choi, H.S. 2000. Identification of nitric oxide synthase in *Flammulina velutipes*. *Mycologia* (92): 1027-1032.
- Spiro, S. 2007. Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiology Reviews* 31(2): 193-211.

- Stakman, E. C., & Jensen, L. 1915. Infection experiments with timothy rust. *Journal of Agricultural Research* 5(5): 211
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., & Loscalzo, J. 1992. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 89(1): 444-448.
- Stuehr, D. J. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1411(2): 217-230.
- Suga, H., Ikeda, S., Taga, M., Kageyama, K. and Hyakumachi, M. 2002. Electrophoretic karyotyping and gene mapping of seven formae speciales in *Fusarium solani*. *Current Genetics* 41: 254-260.
- Szibor, M., Richter, C., & Ghafourifar, P. 2001. Redox control of mitochondrial functions. *Antioxidants and Redox Signaling* 3(3): 515-523.
- Takaya, N. 2002. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94(6): 506-510.
- Takaya, N., Suzuki, S., Matsuo, M., & Shoun, H. 1997. Purification and characterization of a flavohemoglobin from the denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *FEBS Letters* 414(3): 545-548.
- Tan, M. K. & Niessen, M. 2003. Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of *Fusarium* species causing crown rot and head blight of cereals. *Molecular Genetics and Genomics* 107: 811-821.
- Te Biesebeke, R., Levasseur, A., Boussier, A., Record, E., Van den Hondel, C. A., & Punt, P. J. 2010. Phylogeny of fungal hemoglobins and expression analysis of the *Aspergillus oryzae* flavohemoglobin gene fhbA during hyphal growth. *Fungal Biology* 114(2): 135-143.
- Teunissen, H. A., Verkooijen, J., Cornelissen, B. J. & Haring, M. A. 2002. Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Genetics and Genomics*. 268: 298-310.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids Research* 22(22): 4673-4680.
- Turrà, D., & Di Pietro, A. 2015. Chemotropic sensing in fungus–plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 26: 135-140.
- Turrión-Gómez, J. L., & Benito, E. P. 2011. Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Molecular Plant Pathology* 12(6): 606-616.
- Turrión-Gómez, J. L., Eslava, A. P., & Benito, E. P. 2010. The flavohemoglobin BCFHG1 is the main NO detoxification system and confers protection against nitrosative

- conditions but is not a virulence factor in the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* 47(5): 484-496.
- Ullmann, B. D., Myers, H., Chirananand, W., Lazzell, A. L., Zhao, Q., Vega, L. A., Lopez-Ribot, J. L., Gardner, P. R., & Gustin, M. C. 2004. Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 3(3): 715-23.
- Urban, M., Daniels, S., Mott, E., & Hammond-Kosack, K. 2002. *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *The Plant Journal* 32(6): 961-973.
- Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., & Barroso, J. B. 2007. Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* 581(3): 453-461.
- Vallance, P., & Collier, J. 1994. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ: British Medical Journal* 309(6952): 453.
- Van Schoonhoven, A., & Pastor-Corrales, M. A. 1987. CIAT. *Standard evaluation of bean germplasm*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
- Vasudevan, S. G., Armarego, W. L., Shawl, D. C., Lilley, P. E., Dixon, N. E., & Poole, R. K. 1991. Isolation and nucleotide sequence of the hmp gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Molecular and General Genetics* MGG 226(12): 49-58.
- Vieira, A. L., Linares, E., Augusto, O., & Gomes, S. L. 2009. Evidence of a Ca²⁺-NO-cGMP signaling pathway controlling zoospore biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Fungal Genetics and Biology* 46(8): 575-584.
- Vinogradov, S. N. 2008. Chapter Thirty-One-Tracing Globin Phylogeny Using PSIBLAST Searches Based on Groups of Sequences. *Methods in Enzymology* 436: 571-583.
- Vinogradov, S. N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Arredondo-Peter, R., Guertin, M., Gough, J., & Vanfleteren, J. R. 2005. Three globin lineages belonging to two structural classes in genomes from the three kingdoms of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 102(32): 11385-11389.
- Vinogradov, S. N., Hoogewijs, D., Bailly, X., Mizuguchi, K., Dewilde, S., Moens, L., & Vanfleteren, J. R. 2007. A model of globin evolution. *Gene* 398(1): 132-142.
- Voigt, K., Schleier, S., & Brückner, B. 1995. Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 27(6): 528-535.
- Wang, J., & Higgins, V. J. 2005. Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genetics and Biology* 42(4): 284-292.
- Wang, Y., Jiang, C. J., Li, Y. Y., Wei, C. L., & Deng, W. W. 2012. CsICE1 and CsCBF1: two transcription factors involved in cold responses in *Camellia sinensis*. *Plant cell Reports* 31(1): 27-34.

- Wittenberg, J. B., Bolognesi, M., Wittenberg, B. A., & Guertin, M. 2002. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *Journal of Biological Chemistry* 277(2): 871-874.
- Wiemann, P., Brown, D. W., Kleigrew, K., Bok, J. W., Keller, N. P., Humpf, H. U., & Tudzynski, B. 2010. FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Molecular Microbiology* 77(4): 972-994.
- Wong, K. H., Hynes, M. J., & Davis, M. A. 2008. Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* 7(6): 917-925.
- Woo, S. L., Zoina, A., Del Sorbo, G., Lorito, M., Nanni, B., Scala, F. & Noviello, C. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* 86(9): 966-973.
- Xiao, C.L., Chandler, C.K., Price, J.F., Duval, J.R., Mertely, J.C., & Legard, D.E. 2001. Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems. *Plant Disease* 85: 901-909.
- Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3): 1061-1070.
- Yoder, W. T. and Christianson, L. M. 1998. Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. *Fungal Genetic Biology* 23: 68-80.
- Zafra, A., Rodríguez-García, M. I., & Alché, J. D. 2010. Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology* 10(1): 36.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., & Lamb, C. 2004. Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* 136(1): 2875-2886.
- Zhao, X. J., Raitt, D., Burke, P. V., Clewell, A. S., Kwast, K. E., & Poyton, R. O. 1996. Function and Expression of Flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae* evidence for a role in the oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry* 271(41): 25131-25138.
- Zhou, S., Fushinobu, S., Kim, S. W., Nakanishi, Y., Wakagi, T., & Shoun, H. 2010. *Aspergillus oryzae* flavohemoglobins promote oxidative damage by hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394(3): 558-561.
- Zhou, S., Fushinobu, S., Nakanishi, Y., Kim, S. W., Wakagi, T., & Shoun, H. 2009. Cloning and characterization of two flavohemoglobins from *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381(1): 7-11.
- Zhou, Z., Takaya, N., Nakamura, A., Yamaguchi, M., Takeo, K., & Shoun, H. 2002. Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *Journal of Biological Chemistry* 277(3): 1892-1896.

- Zhou, Z., Takaya, N., Sakairi, M. A. C., & Shoun, H. 2001. Oxygen requirement for denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Archives of Microbiology* 175(1): 19-25.
- Zhu, H., & Riggs, A. F. 1992. Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A* 89(11): 5015-5019.
- Zhu, J., Jambhekar, A., Sarver, A., & DeRisi, J. 2006. A Bayesian network driven approach to model the transcriptional response to nitric oxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One* 1(1): e94.
- Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(4): 533-616.